

COPIA CERTIFICADA

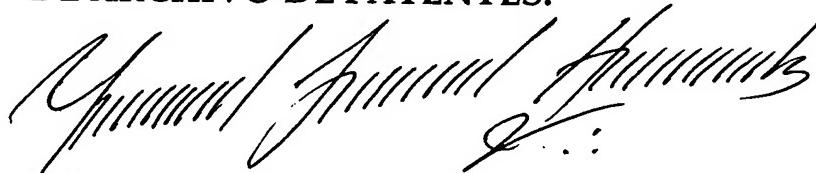
Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta - SOLICITUD, DESCRIPCIÓN, REIVINDICACIONES,... - de solicitud de PATENTE.

Número PA/a/1999/008515 presentada en este Organismo, con fecha 17 DE SEPTIEMBRE DE 1999.

México D.F., 28 DE AGOSTO DE 2006.

"2006, Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas,
Don Benito Juárez García ".

COORDINADOR DEPARTAMENTAL
DE ARCHIVO DE PATENTES.



T.B.A. YOLANDA JARDÓN HERNÁNDEZ



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT



<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente
<input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
<input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial
<input type="checkbox"/> Modelo
<input type="checkbox"/> Dibujo

Uso exclusivo Delegaciones SECOFI	Uso exclusivo del IMPI
Sello	No. de expedición 998515
Folio de entrada SEP 17 PM	No. de folio de entrada 1 48
Fecha y hora de recepción DIRECCIÓN DE PATENTES	Fecha y hora de presentación

Antes de llenar la forma lee las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor(*)	<input type="checkbox"/> El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s):	PIHCSA MEDICA, S.A. DE C.V.
2) Nacionalidad (es):	Mexicana
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal:	Av. Prolongación División del Norte No. 4280 Col. Prado Coapa C.P. 14300 México, Distrito Federal
(*) Debe llenar el siguiente recuadro	4) Teléfono (clave):
	5) Fax (clave):

01791

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s):	JDR. JUAN ARMENDARIZ BORUNDA y DR. ESTUARDO AGUILAR CÓRDOVA
7) Nacionalidad (es):	Mexicanos
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal:	Av. Prolongación División del Norte No. 4280 Col. Prado Coapa C.P.14300
9) Población, Estado y País:	México, Distrito Federal
9) Teléfono (clave):	10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)	
11) Nombre (s): LIC: EDUARDO CORREA E., LIC. JOSE F. HINOJOSA CUELLAR, LIC. MARTIN MICHAUS ROMERO	12) R.G.P:
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Paseo de los Tamarindos 400 - A, Piso 9 Col. Bosques de las Lomas, Código Postal 05120	Población, Estado y País: México, D.F. México
14) Teléfono (clave): 5261-0400	15) Fax (clave): 5261-0496

16) Denominación o Título de la Invención:

VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES Y SU UTILIDAD EN EL TRATAMIENTO DE DIVERSOS TIPOS DE FIBROSIS HEPÁTICA, RENAL, PULMONAR Y CICATRICES HIPERTRÓFICAS.

17) Fecha de divulgación previa 09 06 99 Día Mes Año	18) Clasificación Internacional	uso exclusivo del IMPI
19) Divisional de la solicitud		20) Fecha de presentación

Número	Figura Jurídica	Día Mes Año
21) Prioridad Reclamada: País	Fecha de presentación Día Mes Año	No. de serie

Lista de verificación (uso interno)	
<input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tarifa	<input type="checkbox"/> Documento de gestión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input type="checkbox"/> Constancia de depósito de material biológico
<input checked="" type="checkbox"/> Dibujo (s) en su caso	<input type="checkbox"/> Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> Resumen de la descripción de la invención	<input type="checkbox"/> Documento (s) de prioridad
<input type="checkbox"/> Documento que acredita la personalidad del apoderado Original en	<input type="checkbox"/> Traducción

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

	LIC. JOSÉ F. HINOJOSA CUELLAR	México, D.F., a 17 de Septiembre de 1999
Nombre y firma del solicitante o su apoderado		Lugar y fecha 205/17480

Consideraciones generales para su llenado:

- Este formato de solicitud debe llenarse preferentemente a máquina, no obstante podrá presentarse con letra de molde legible y su distribución es gratuita.
- sólo se recibirá el formato de solicitud debidamente requisitado y en idioma español.
- El formato de solicitud y sus documentos anexos deben presentarse en el Departamento de Recepción y Control de Documentos de Patentes del IMPI, ubicado en Periférico Sur número 3106, 3er piso, colonia Jardines del Pedregal, 01900, México, D.F., en el horario de 9:00 a 16:00 horas de lunes a viernes o en la ventanilla de las Delegaciones O Subdelegaciones Federales de la SECOFI.
- La firma del solicitante debe ser autógrafo en cada formato de solicitud.
- En el formato de solicitud marque con una cruz en el recuadro la solicitud que desea presentar.
- En caso de Registro de Diseño Industrial señale además si se trata de un modelo o un dibujo.
- La denominación o título debe ser connotativa de la invención.
- Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- En la solicitud de invención que sea divisional de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud.
- El derecho de reclamar la prioridad sólo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial. Proporcionar los siguientes datos:
- País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país.
- Las solicitudes podrán remitirse por correo, servicios de mensajería u otros equivalentes, asimismo se podrán presentar por transmisión telefónica facsimilar en términos del artículo 5o. del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- Se autoriza su libre reproducción siempre y cuando no se altere.

Trámite al que corresponde la forma: - Solicitud de Patente, Registro de Diseño Industrial y Registro de Modelo de Utilidad
Número de Registro Federal de Trámites Empresariales: IMPI-00-001

Fecha de autorización de la forma por parte de la Oficialía Mayor de SECOFI: 07-I-1999

Fecha de autorización de la forma por parte de la Unidad de Desregulación Económica: 07-I-1999

Fundamento Jurídico-administrativo:

Ley de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27-VI-91, reformas D.O.F. 02-VIII-94; 26-XII-97)

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial (D.O.F. 23-XI-94)

Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el IMPI (D.O.F. 14-XII-94)

Acuerdo por el que se establecen los plazos máximos de respuesta a los trámites ante el IMPI (D.O.F. 10-XII-96)

Tarifa por los servicios que presta el IMPI

Documentos anexos:**Solicitud de Patente y Registro de Modelo de Utilidad**

- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (original y copia)
- Descripción, reivindicación, resumen y dibujo (triplicado)
- Solicitud de Registro de Diseño Industrial
- Comprobante de pago de la tarifa (original y copia)
- Descripción, reivindicación y dibujo o fotografía (triplicado)
- Documentos adicionales que deberán presentarse en su caso:
- Constancia de depósito de material biológico
- Acreditación de personalidad del apoderado, en su caso (original)
- Acreditación del poderdante en el caso de persona moral, señalando el instrumento donde obran dichas facultades y acta constitutiva (original)
- Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos (original)
- Documento comprobatorio de divulgación previa, en su caso (original y copia) ANEXO
- Documento de prioridad y su traducción, en su caso (copia certificada expedida por la oficina extranjera)
- Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda (original)

Tiempo de respuesta:

El plazo máximo de primera respuesta es de 3 meses.

Número telefónico para quejas:

Contraloría Interna en el IMPI 5624-04-12 ó 13 (directo)
5624-04-00 (comutador)
Extensiones: 4628, 4629 y 4677

Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite,
sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL
a los teléfonos: 5480-20-00 en el D.F. y área metropolitana, del Interior de
la República sin costo para el usuario al 01-800-00-14800 o desde Estados
Unidos y Canadá al 1-888-594-3372.

Número telefónico del responsable del trámite para consultas: 5624 04 00 extensiones 4748 y 4703

"VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES Y SU UTILIDAD EN
EL TRATAMIENTO DE DIVERSOS TIPOS DE FIBROSIS
HEPATICA, RENAL, PULMONAR Y CICATRICES HIPERTROFICAS"

5

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con la construcción de vectores adenovirales recombinantes que portan genes exógenos que codifican para proteínas terapéuticas útiles en el tratamiento de cirrosis hepática y fibrosis generalizada, como fibrosis renal, fibrosis pulmonar, cicatrices hipertróficas y keloides (fibrosis de la piel), y/o en otros órganos blanco susceptibles a padecerla. Así como un mecanismo de reconocimiento tejido-específico de las células afectadas mediante el envío de genes "terapéuticos" a los órganos cirróticos.

Asimismo, la invención proporciona una vía efectiva para el tratamiento de la fibrosis mediante el empleo de los vectores adenovirales recombinantes que aquí se reclaman, así también el proceso para preparar dichos vectores, la composición farmacéutica que los contiene, y sus usos terapéuticos en el tratamiento de la fibrosis, lo cual tiene una gran expectativa comercial en la industria farmacéutica y también presenta una importante alternativa como terapia génica experimental para el tratamiento de enfermedades

crónico-degenerativas que cursan con fibrosis con gran aplicación terapéutica en el campo de la medicina.

INTRODUCCION

FISIOPATOLOGIA DE LA CIRROSIS HEPATICA

La cirrosis hepática es una enfermedad que resulta de un daño hepático crónico, éste puede ser tóxico (ingesta crónica de alcohol), infeccioso (hepatitis viral, principalmente por virus de la hepatitis B y/o C), inmunológico (cirrosis biliar primaria), por obstrucción de vías biliares (cirrosis biliar secundaria), metabólico (Enfermedad de Wilson). Todas las formas de cirrosis tienen características comunes: síntesis y depósito excesivo de proteínas de la matriz extracelular (MEC) (principalmente colágena I y en menor cantidad, colágenas tipo IV y III), y como consecuencia formación de nódulos de hepatocitos, vascularización anormal e hipertensión portal (Antoni PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sabin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. Bulletin of the World Health Organization. 1977; 55:521-540 y Scott L. Friedman The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. The New England Journal of Medicine 1993, vol 328 No. 25:1828-1835). Estos procesos fisiopatológicos conllevan a una alteración en el suministro sanguíneo y por ende en la nutrición de la célula hepática. Independientemente del

agente etiológico y de diferencias morfológicas, todas las formas de cirrosis tienen como fin común la falla hepática y por ende la muerte del paciente.

Como consecuencia del exceso en el depósito de 5 proteínas colagénicas en el espacio subendotelial de los sinusoides (Espacio de Disse), surgen diversos cambios en el microambiente hepático: pérdida de las vellosidades de los hepatocitos, aparición de una membrana basal formada por colagenas IV y I recubriendo los sinusoides y pérdida de las 10 fenestraciones de las células endoteliales que forman los sinusoides. A todo este proceso se le conoce como "capilarización" de los sinusoides (Scott L. Friedman The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. The New England Journal of Medicine 1993, vol. 15 328 No. 25:1828-1835). Consecuentemente el hígado es incapaz de mantener la concentración fisiológica de solutos en la vena hepática terminal, en otras palabras, se presenta insuficiencia hepática. Esta capilarización, con la 20 formación de un endotelio continuo (colágena de membrana basal) y acúmulo de otras proteínas colagénicas, representa una barrera al intercambio normal y bi-direccional de moléculas entre el plasma y hepatocitos, como se puede apreciar en la figura 1, en donde la cirrosis hepática se caracteriza por la acumulación de colágena tipo I en el 25 hígado. Con el exceso en el depósito de esta proteína se

impide el libre intercambio de nutrientes entre el torrente circulatorio y el hígado, así como la destoxicación de agentes nocivos realizada por este órgano, principales causas de la patofisiología de la enfermedad. Hasta el momento aún 5 no se ha descrito ningún agente terapéutico que revierta y/o prevenga con 100% de efectividad la acumulación progresiva de la colágena hepática.

Dichas alteraciones fisiopatológicas que se presentan en la cirrosis hepática son una constante en común para 10 aquellos órganos que también la padecen, como son por ejemplo, el pulmón, corazón, riñón, piel, entre otros, los cuales no deberán ser considerados como limitativos del alcance de protección de la invención. Por lo que la metodología que aquí se está presentando para el tratamiento 15 de la cirrosis hepática podría aplicarse también a aquellos órganos que son susceptibles a o que se ven afectados por la fibrosis.

VECTORES VIRALES Y TERAPIA GENICA HEPATICA

20 Esta tecnología puede implementarse con vectores virales o no-virales. Los estudios previos incluyen plásmidos y liposomas, (DOTMA) catiónicos y aniónicos, etc. Entre los métodos que emplean vectores virales, los más comúnmente usados han sido los retrovirales y los 25 adenovirales.

En un buen número de protocolos se utilizan vectores retrovirales para introducir genes en hepatocitos (Douglas JT, and Curiel DT. Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine March/April 1997 44-53). Sin embargo, 5 se debe tener precaución porque estos vectores pueden generar potencialmente virus replicación-competentes. Entre las ventajas que tienen estos vectores, está su habilidad para integrar su genoma de manera estable en el genoma de la célula huésped, lo cual confiere la posibilidad de expresión, 10 de manera indefinida, del transgen terapéutico clonado en el retrovirus. Por otro lado, hasta la fecha, ningún estudio ha reportado incidencias de mutagenesis por inserción o activación de oncogenes por la integración del retrovirus siempre y cuando, los virus usados no sean replicación- 15 competentes. No obstante estas consideraciones, el uso de vectores retrovirales para transducir genes al hígado se limita por las siguientes consideraciones: 1) Estos vectores infectan solamente células que se dividen activamente y 2) se obtienen títulos de partículas virales muy bajos de las 20 líneas celulares empaquetadoras usadas para amplificar estos virus (Graham FL, and Van Der Eb AJ. A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. Virology 1973, 52:456-467). Estas dos limitantes han sido exitosamente superadas en otros protocolos de Terapia Génica 25 mediante la inducción de la proliferación de hepatocitos "in

vivo" por el uso de factores de crecimiento hepático y por hepatectomía parcial, procedimiento quirúrgico mediante el cual se remueve el 70% del hígado y de esta manera se estimula la división de las células hepáticas "in vivo". El empleo de Vectores Lentivirales ha permitido la superación de manera parcialmente significativa, de estas limitaciones, pues estos pueden transducir células que no se dividen.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La cirrosis hepática es una enfermedad crónica del hígado, en donde ocurre la destrucción difusa y la regeneración de las células parenquimatosas hepáticas y que resulta en el incremento difuso del tejido conectivo provocando la distorsión de la arquitectura lobular del
15 hígado e induciendo alteraciones hemodinamicas. Por lo tanto, algunas estrategias para el tratamiento de la cirrosis hepática podría incluir la prevención y/o reversión de la fibrogénesis, estimulación de la mitosis hepática y reorganización de la arquitectura del tejido hepático. Es
20 por eso que se dan a conocer los documentos del estado de la técnica relacionados con la presente invención, los cuales se mencionan a continuación con el propósito de incluirlos tan sólo como referencias.

La Patente Norteamericana No. 5,240,846, se refiere al
25 uso de terapia génica para tratar fibrosis quística. Utiliza

el envío y la expresión de un gen que se denomina CFTR, el cual induce una corrección estable de la regulación del canal de cloro. Este defecto se encuentra presente en células epiteliales. En dicha invención se utilizan vectores adenovirales recombinantes, así como vectores plasmídicos. Sin embargo, no tiene ninguna relación con los genes terapéuticos de la presente invención. Asimismo, la Patente Norteamericana No. 5,910,487, describe la utilización de vectores plasmídicos para el envío de moléculas terapéuticas, pero no existe ninguna relación con el envío de los genes de metaloproteasas MMP-8 latente y activa , MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13 o de uPA silvestre y/o modificado o de *Smad7* o del receptor truncado tipo II de TGF- β (Transforming Growth Factor- β) como aquí se está presentando. La Patente Norteamericana No. 5,827,703 se relaciona con el uso de vectores adenovirales y vectores adenovirales modificados para enviar genes, sin embargo ninguno de estos vectores contienen los genes utilizados en esta invención para el tratamiento de la fibrosis.

La Patente Norteamericana No. 5,770,442 reclama el uso de un adenovirus recombinante que comprende un gen que dirige la expresión de una proteína denominada "fiber" o a una proteína denominada "fiber quimera", sin embargo, no menciona de manera específica cuál es el gen terapéutico. También hace referencia al método de terapia génica, involucrando el

uso de tal adenovirus y un vector de transferencia adenoviral para la generación de tales adenovirus recombinantes. Sin embargo, no se menciona absolutamente nada en relación a la utilización de genes terapéuticos clonados e insertados en vectores adenovirales recombinantes que en la presente invención se utilizan para el envío a hígados con fibrosis, así como a otros órganos como son el riñón, pulmón y cicatrices hipertróficas y otros. Dichos genes terapéuticos son los genes que codifican para las metaloproteasas MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; el activador de plasminógeno derivado de la uroquinasa uPA silvestre y/o modificado; Smad7 y el receptor truncado tipo II de TGF- β , que en la presente se reclaman. Por extensión se incluyen también otros miembros de la familia de genes representados.

La Patente Norteamericana No. 5,166,320, se relaciona con la utilización de un sistema de envío dirigido de genes para introducir genes exógenos en células hepáticas de mamífero. Pero no hay ninguna relación con los genes que se pretenden enviar directamente a hígados cirróticos o a riñones o pulmones fibróticos.

La Patente Norteamericana No. 5,872,154, describe un método para reducir la respuesta inmune inducida por un vector adenoviral mediante la co-administración del vector adenoviral recombinante y un modulador inmune seleccionado, que funciona inhibiendo la formación de anticuerpos neutralizantes y/o reduciendo la muerte de las células infectadas viralmente. La Patente Norteamericana No.

5,871,982, divulga un vector híbrido, el cual comprende una porción de un adenovirus, junto con una porción de un vector adeno-asociado viral que contiene un transgen seleccionado, también describe un virus híbrido mediante la unión de un 5 conjugado con un policitón a un gen red del adeno-asociado para formar una partícula simple. A diferencia de la presente invención, en la cual no se emplearon virus híbridos, sino solamente vectores adenovirales. Además, en la patente arriba citada no se menciona el gen o transgen o 10 el gen terapéutico utilizado. En la Patente Norteamericana No: 5,856,152, se da a conocer la construcción de un vector híbrido, el cual contiene la porción de un vector adenoviral en combinación con un virus adeno-asociado y un gen seleccionado, con lo cual se producen grandes cantidades de 15 vectores recombinantes, pero que no portan genes terapéuticos clonados como se describen en esta invención, en donde se utilizan genes terapéuticos específicos para el tratamiento de fibrosis hepática, fibrosis renal y cicatrices hipertróficas. La Patente Norteamericana 5,547,932, reclama 20 una composición de complejos de ácidos nucleicos para transfectar células eucarióticas. Estos complejos están formados por ácidos nucleicos y otra substancia que tiene una afinidad para el ácido nucleico y opcionalmente un factor internalizador, como puede ser un virus o un componente del 25 virus, que puede estar conjugado. Asimismo, utilizan

componentes de determinados vectores adenovirales o determinados virus como el Ad2 o el Ad5, pero no mencionan los genes que internalizan en el citoplasma y eventualmente en el núcleo de estas células eucarióticas. De igual manera, 5 la Patente Norteamericana No. 5,521,291, se relaciona con adenovirus conjugados que están unidos mediante un anticuerpo a una substancia que tiene afinidad por ácidos nucleicos, de esta manera se transportan genes recombinantes al interior de las células eucarióticas. Estos complejos conjugados y ácidos 10 nucleicos son internalizados en la célula, pero no se mencionan de manera específica los genes terapéuticos que pueden ser enviados. En dicha patente tampoco se menciona el uso de tales adenovirus para tratar fibrosis o cirrosis hepática o cualquier otro tipo de fibrosis como se describe 15 en la presente invención.

La Patente Norteamericana No. 5,585,362, comprende un vector adenoviral mejorado y métodos para hacer y usar tales vectores. Aún cuando no se divulga el uso de vectores adenovirales en dicha patente, los vectores adenovirales 20 descritos en la presente invención se utilizaron como vectores para el envío de genes terapéuticos.

La Patente Norteamericana No. 5,756,086, reclama un adenovirus, el cual está representado por una proteína denominada "fiber", además el adenovirus incluye un ligando, 25 que es específico para un receptor localizado en un tipo

celular determinado. Este adenovirus puede tener al menos una porción de esta proteína denominada "fiber" y puede ser removida y reemplazada con un ligando, el cual es específico para un receptor en determinadas células de la economía, como por ejemplo hepatocitos. Estos adenovirus 5 pueden incluir un gen que codifique para un agente terapéutico. En base a lo anterior, la diferencia técnica sobresaliente de la invención propuesta con respecto a lo divulgado en dicha patente, es la especificidad del agente terapéutico como metaloproteasas MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; uPA silvestre y/o 10 modificado(Urokinase Plasminogen Activator), el receptor truncado tipo II de TGF- β y Smad7 para el tratamiento de diversas fibrosis.

La Patente Norteamericana No. 5,895,759, reclama un vector específico de tejido (hígado) para terapia génica que 15 puede ser usado para enviar genes a un hígado dañado. Dicho vector está acoplado a un promotor de manera química o enzimática y puede estar acoplado también a un anticuerpo empaquetado en una cubierta polipeptídica. Además el vector o el virus para ser ensayado es el virus de la hepatitis B, 20 de manera tal que el envío de genes a hígados dañados que se describen en dicha patente, utiliza un sistema completamente diferente al que se pretende en esta invención y no existe relación con el proceso de fibrosis o cirrosis a tratar. La Patente Norteamericana No. 5,559,099, describe un vector 25 recombinante adenoviral que comprende una proteína quimérica

del adenovirus que se denomina pentona, la cual incluye a una secuencia non-pentona y un gen terapéutico para desarrollar un método de terapia génica, el cual involucra el uso de tal adenovirus, vectores adenovirales de transferencia para la 5 recombinación de tales vectores adenovirales conteniendo un gen terapéutico. Asimismo, la Patente Norteamericana No. 5,885,808, reclama también el uso de adenovirus con moléculas de unión del adenovirus a células de la economía, cuyas moléculas han sido modificadas. Al igual que en las Patentes 10 Norteamericanas Nos. 5,846,782 y 5,712,136, en donde se emplean vectores adenovirales, los cuales han sido modificados para contener diferentes dominios peptídicos.

Finalmente la Patente Norteamericana No. 5,670,488, se relaciona con vectores para terapia génica, los cuales son 15 especialmente útiles para fibrosis quística y también menciona el desarrollo de métodos para usar estos vectores. La posible relación de la invención que aquí se está reclamando, con respecto a lo divulgado en el estado de la técnica citada, radica en el uso de vectores adenovirales, 20 que pueden ser modificados, así como el uso de promotores inducibles para los genes que van a ser insertados en estos vectores adenovirales, sin embargo, las características técnicas de la presente invención están dirigidas a la utilización específica de genes terapéuticos para tratar 25 fibrosis de diferentes tipos como son fibrosis hepática,

renal y pulmonar, así como cicatrices hipertróficas.

La importancia de la presente invención a diferencia de lo descrito en los documentos del estado de la técnica antes citados, radica en las características técnicas del propio invento, así como en las ventajas adicionales que se derivan del mismo, las cuales se describen con más detalle a continuación.

VECTORES ADENOVIRALES

En la presente invención se han decidido utilizar VECTORES ADENOVIRALES en base a varias consideraciones: 1) Estos vectores pueden generarse a títulos muy altos de partículas infecciosas por ml: (10^9 - 10^{10}); 2) Infectan una gran variedad de células, sin embargo, cuando son administrados por vía endovenosa la mayor parte se localiza en el órgano hepático; 3) Transfieren eficientemente genes a células que no se encuentran en división y 4) Raramente, se integran en el genoma del huésped, lo que evita el riesgo de transformación celular por mutagénesis insertional (Douglas JT, And Curiel DT. Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine March/April 1997 44-53 y Zern AM, And Kresina TF. Hepatic drug delivery and gene therapy (Hepatology 1997 vol. 25, No. 2, 484-491)).

Los adenovirus son probablemente los vehículos o vectores más prometedores para el envío de genes en los

protocolos de terapia génica en humanos, ya que poseen un atributo único que los provee de gran estabilidad cuando son administrados al torrente sanguíneo. Esta característica les permite ser utilizados de manera eficiente en protocolos clínicos con una administración cómoda para el paciente por vía intravenosa (Douglas JT, And Curiel DT. Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine March/April 1997 44-53).

Los adenovirus son virus de ADN de doble cadena, tienen una estructura icosaédral, los cuales infectan a una gran variedad de tipos celulares de mamíferos, lo que puede reflejar la expresión ubicua de un receptor de superficie celular específico y aún no identificado. La unión a las células es mediante el componente protéico de la cápside del adenovirus y el virus entra a la célula por endocitosis mediada por receptor.

Han sido identificados más de 40 diferentes serotipos humanos de adenovirus, de los cuales los tipos 2 (Ad2) y 5 (Ad5) han sido más extensamente estudiados y, por lo tanto, más utilizados en la adaptación como vectores para terapia génica. Una característica muy importante de estos 2 serotipos es que jamás se les ha asociado con procesos malignos humanos.

La estrategia para la construcción de adenovirus recombinantes se basa en la organización del genoma

adenoviral. La expresión de los genes adenovirales ocurre en dos fases, temprana y tardía, que se definen con respecto al tiempo de replicación del genoma adenoviral. Los genes tempranos se codifican en cuatro unidades transcripcionales distintas. E1, E2 y E4 codifican para proteínas regulatorias esenciales que inducen la replicación del DNA adenoviral, el gen E3 es un gen no esencial. Los productos de los genes tardíos incluyen las principales proteínas de la cápside, las cuales se transcriben de un promotor único (Graham FL, And 10 Van Der Eb AJ. A New Technique for the Assay of Infectivity of Human Adenovirus 5 DNA. Virology 1973, 52:456-467).

Los adenovirus recombinantes se generan por la introducción del gen exógeno o secuencia de ADN de interés en sustitución de regiones del genoma adenoviral requeridos para 15 la replicación del virus. Los vectores adenovirales recombinantes sufren delecciones en las regiones E1 y E3 de su genoma. La generación de adenovirus recombinantes se realiza tanto por el reemplazo de las regiones E1, de la E3, o bien por inserción del gen exógeno entre la región E4 y el extremo 20 derecho del genoma viral. Los vectores basados en la inserción del gen exógeno en el extremo derecho del genoma adenoviral o por reemplazo de la región E3 conservan la capacidad de replicación. Por el contrario, el reemplazo de la región temprana E1 produce un vector defectuoso en su 25 capacidad de replicación que, por lo tanto, se pueden

propagar únicamente en una línea celular que abastezca en "trans" a las funciones ausentes de la región adenoviral remplazada o en la presencia de un virus colaborador. De estos, los más utilizados comúnmente como vectores de transferencia de genes son los adenovirus defectuosos en replicación (Douglas JT, And Curiel DT. Adenoviruses as Vectors for Gene Therapy. Science and Medicine March/April 1997 44-53).

La construcción de los vectores adenovirales, así como su aplicación para el tratamiento de la fibrosis se muestran en los ejemplos que posteriormente se describen.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

A continuación se dan a conocer los objetivos y ventajas que se derivan de esta invención.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para preparar los vectores adenovirales recombinantes pAdGFP-MMP-8, mediante la clonación de los genes reporteros Lac-Z y GFP y el gen terapéutico de la colagenasa MMP-8 (metaloproteasa).

Otro objetivo de la invención es proporcionar un vector adenoviral recombinante con un gen exógeno o secuencia de ADN de interés que codifica a proteínas terapéuticas útiles en el tratamiento de la fibrosis generalizada en los órganos blancos susceptibles a padecerla. Tales genes son, pero no están limitados a MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13 y uPA silvestre y/o modificado.

También se proporcionan en la presente invención composiciones farmacéuticas que contienen los vectores adenovirales recombinantes en cantidades terapéuticamente efectivas de partículas virales para tratar la fibrosis generalizada. Así también, como sus usos y aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la fibrosis.

Una ventaja todavía de mayor relevancia en el tratamiento de la fibrosis generalizada, particularmente el de la cirrosis hepática, es que el envío de los genes terapéuticos se lleva a cabo mediante el reconocimiento tejido-específico por la vía de administración empleada.

Otra ventaja de los usos terapéuticos de la invención, la cual está dirigida en principio al tratamiento de la cirrosis hepática, es el tratamiento de la fibrosis generalizada en otros órganos blancos susceptibles a padecerla, que incluyen, pero que no quedan limitados al tratamiento de la fibrosis en pulmón, corazón, piel, riñón entre otros, en animales mamíferos, incluyendo al hombre.

Otro objetivo es el diseño de una tecnología para enviar eficientemente genes a hígados de animales que cursan con cirrosis, que asemejan a dos tipos de cirrosis que afecta a humanos (cirrosis por alcohol y cirrosis biliar primaria).

Otra ventaja que resulta del tratamiento de la fibrosis es que el adenovirus recombinante no induce toxicidad letal en ninguno de los animales inyectados con los

vectores.

Asimismo, otro objetivo de la invención nos permite discriminar completamente la modificación de la reacción de tinción con X-Gal entre la actividad de la β -galactosidasa endógena tisular y la β -galactosidasa bacteriana inducida por la acción infectiva del vector adenoviral. Así como, la utilización de la proteína verde fluorescente, nos permite verificar la transducción *in vivo* de los órganos en las ratas para verificar si la administración del vector fue adecuada, 10 si la expresión permanece y además de que no se sacrifica al animal se le puede dar seguimiento posterior a la cirugía.

Finalmente, todo esto nos permite sugerir que nuestro sistema constituye un vehículo eficiente para enviar genes terapéuticos como metaloproteasas MMP-8 latente y activa, 15 MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; colagenasas que degraden el exceso de colágenas depositadas y/o genes que codifiquen para proteínas estimuladoras de regeneración hepática como el uPA silvestre y/o modificado (Urokinase Plasminogen Activator); HGF (Factor de Crecimiento de Hepatocitos); el receptor truncado tipo II de TGF- β y *Smad7* a hígados de ratas con cirrosis con el objeto de restablecer las funciones normales del hígado, u otros órganos afectados por la misma patología.

Es así, como en la presente invención se dan a conocer el proceso de preparación de los vectores 25 adenovirales recombinantes, composiciones farmacéuticas y

usos terapéuticos para el tratamiento de la fibrosis, particularmente en el tratamiento de la cirrosis hepática.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

5 Otras particularidades y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, de los objetivos y modalidades preferidas, de las reivindicaciones anexas y de los dibujos o figuras que se acompañan, en donde:

10 La figura 1, muestra la fisiopatología celular de la Cirrosis Hepática;

La figura 2, muestra una prueba de concepto de como la Terapia Génica funciona revirtiendo el proceso que cursa con cirrosis;

15 La figura 3, es una representación esquemática que muestra la clonación y la producción del vector adenoviral Ad5 β -gal;

La figura 4, muestra el desarrollo esquemático del sistema AdEasy para la generación de Adenovirus Recombinantes, específicamente el pAdGFP-MMP-8;

20 La figura 5, muestra el análisis de la expresión de β -galactosidasa en células en cultivo;

La figura 6, muestra la determinación de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células en cultivo;

La figura 7, muestra la expresión de la β -galactosidasa en diferentes órganos después de la infusión con Ad5- β gal a través de la vena iliaca;

La figura 8, muestra la determinación del tropismo 5 del vector Ad5- β gal a diferentes órganos de los animales de experimentación cirróticos mediante intoxicación crónica con CC1₄, demostrando que el principal órgano blanco es el hígado;

La figura 9, muestra la determinación del tropismo 10 del vector Ad5 β gal a diferentes órganos de los animales de experimentación cirróticos mediante ligadura del ducto biliar, demostrando que el principal órgano blanco es el hígado;

La figura 10, muestra cortes histológicos de imágenes representativas de la eficiencia de los ensayos de transducción "in vivo" del vector Ad5- β gal en ratas 15 cirróticas con administración crónica de CCl₄;

La figura 11, muestra cortes histológicos de imágenes representativas de la eficiencia de los ensayos de transducción "in vivo" del vector Ad5- β gal en ratas 20 cirróticas por ligadura del ducto biliar común;

La figura 12, muestra la determinación "in vivo" de la expresión de la proteína verde fluorescente;

La figura 13, muestra la estrategia de clonación de las MMP-8 latente y MMP-8 activa;

La figura 14, muestra los mecanismos de la formación 25 de complejos con el DNA de las MMP-8s para ensayos de

transfección "in vitro" en células de origen hepático (HepG2);

La figura 15, muestra la comprobación mediante electroforesis en geles de agarosa del éxito de las 5 clonaciones de los cDNAs de MMP-8 en los plásmidos apropiados;

La figura 16, muestra la eficiencia de transfección en células HepG2 (células de origen hepático) con los plásmidos de β -galactosidasa y pcDNA-MMP-8;

10

La figura 17, muestra el análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a la transcriptasa reversa (RT-PCR) de los RNA mensajeros de MMP-8;

15 La figura 18, muestra la determinación de la actividad colagenolítica en la proteína secretada al medio de cultivo por las células HepG2 después de ser transfectadas con los cDNAs de MMP-8 latente y MMP-8 activa;

20 La figura 19, muestra la regulación hormonal de la expresión del gen de MMP-8 bajo el control transcripcional del promotor regulable PEPCK y

La figura 20, muestra el ensayo dosis-respuesta de las diferentes dosis usadas para determinar la respuesta óptima de transducción hepática in vivo con el gen reportero 25 de β -galactosidasa.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Existen muchos reportes en los que se demuestra que administrando por vía sistémica los vectores adenovirales recombinantes (AdR) en animales de experimentación sanos, el 5 órgano de predilección a donde migran es el hígado. Hasta la fecha no se conocía si los AdR eran capaces de transducir hígados de ratas con cirrosis. Como ya se mencionó, la cirrosis hepática se caracteriza por un aumento de la fibrosis en todo el parenquima hepático principalmente 10 alrededor de las venas central y portal, formando una barrera que impide el libre intercambio entre el sinusoides y los hepatocitos (Antoni PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sabin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. Bulletin of 15 the World Health Organization. 1977;55:521-540 y Scott L. Friedman The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. The New England Journal of Medicine 1993, vol 328 No. 25:1828-1835), motivo por el cual se diseñó este protocolo para verificar si aun con esta 20 barrera se podía enviar genes al hígado.

Por lo tanto, nuestra hipótesis es: los vectores adenovirales recombinantes que contienen los genes reporteros Lac-Z y de la GFP (Green Fluorescent Protein), son capaces de transducir a los hígados de las ratas con cirrosis aun cuando 25 la arquitectura lobular del órgano está alterada.

De tal forma que podríamos enviar a estos hígados, genes terapéuticos como colagenasas **MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; Urokinase-Plasminogen Activator Upa silvestre y/o modificado; el receptor truncado tipo II de TGF- β y Smad7**, que degraden el exceso de proteínas colagénicas depositadas y/o que impiden la síntesis exacerbada de proteínas colagénicas, como se muestra en las figuras 2 y 18 y/o genes que codifiquen para proteínas estimuladoras de regeneración hepática como el uPA con el objeto de restablecer las funciones normales del hígado como se ejemplifica en la figura 2.

Con el desarrollo de la invención que se reclama en la presente, se inicia una línea de investigación para realizar terapia génica como una alternativa para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, específicamente de la cirrosis hepática en humanos, al establecer un vehículo eficiente para enviar genes al hígado que produzcan proteínas terapéuticas que ayuden a restablecer las funciones normales del hígado, ver la figura 2, en donde se muestra como enviando de manera eficiente un gen terapéutico al hígado, en este caso una colagenasa (*metaloproteasas de matriz, MMPs*), se puede lograr la degradación de la colágena a través de la sobre-expresión de estas metaloproteasas.

En la figura 3, se esquematiza la estrategia para la clonación y producción de un vector adenoviral. El plásmido

pΔElsp1B que contiene secuencias del adenovirus Ad5, al cual se le insertó el gen reportero de origen bacteriano lac-Z. Este plásmido se recombinó con el pBHG10 para obtener partículas virales completas después de co-transfектarse en 5 la línea celular 293. El vector pAdGFP se obtuvo de la siguiente manera: El gen de la MMP-8 (proveniente del plásmido PEPCK-MMP8) se clonó en el vector de envío, pAdTrack-CMV, el plásmido resultante es linearizado dirigiendo con la endonucleasa de restricción Pme I, y 10 después es cotransformado en bacterias E. coli (BJ5183) con el plásmido pAdEasy-1, se seleccionaron las colonias recombinantes mediante resistencia a kanamicina, y la recombinación es confirmada por análisis de restricción con endonucleasas. Finalmente, el plásmido recombinante 15 linearizado es transfectado en la linea celular empaquetadora (células 293), los adenovirus recombinantes se obtienen dentro de 7 a 12 días como se esquematiza en la figuras 3 y 4 (TongChuan H., Shibin Z., Luis T., Jian Y., Kenneth W. and Vogelstein Bert: A simplified system for generating 20 recombinant adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 95:2509-2514, March 1998). Para evaluar el grado de transducción *in vitro* se utilizó la línea celular HepG2 de origen hepático y con macrófagos peritoneales aislados de ratón. En la figura 5 se muestra la expresión de la β- 25 Galactosidasa en células en cultivo. A), B) y C)

corresponden a células HepG2 (320X); D), E) y F) son macrófagos peritoneales de ratón (100X). En C y F se muestran las células transducidas con 1×10^8 partículas virales/ml del vector Ad5 β -Gal. Se realizaron tres técnicas para 5 comparar el grado de incorporación del gen reportero Lac-Z, se administró a cada caja de cultivo el plásmido pPGK β Gal mediante precipitación con fosfato de Calcio (Chen C, And Okayama H. Calcium Phosphate-Mediated Gene Transfer, a Highly Efficient System for Stably Transforming Cells with Plasmid 10 DNA. *Biotechniques* 1988, 6:632-638), complejos de ADN-Polilisina-Lactosa (Martínez-Fong D, Mullersman JE, Purchio AF, Armendariz-Borunda J, And Martinez-Hernandez A. Nonenzymatic Glycosylation of Poly-L-lysine: A new Tool for Targeted Gene Delivery. *Hepatology*, Vol. 20, No. 6: 1602-15 1608), con los vectores Ad5- β gal y pAdGFP-MMP8. La visualización de la actividad de la β -gal se verificó con el reactivo X-gal y la GFP en un microscopio estereoscópico de fluorescencia. Para el ensayo *in vivo* se estandarizó el 20 revelado de la β -gal utilizando diferentes pHs de la suspensión de revelado con el reactivo X-gal (Weiss DJ, Ligitt D, and Clark JG. In Situ Histochemical Detection of β -Galactosidase Activity in Lung: Assesment of X-gal Reagent in Distinguishing LacZ Gene Expression and Endogeneous β -Galactosidase Activity. *Human Gene Therapy* September 1, 25 1997, 8:1545-1554). Los modelos de cirrosis hepática

- experimental que se utilizaron son: a) intoxicación por tetracloruro de carbono (CCl_4), en el que se establece la cirrosis hepática a partir de la octava semana de la administración intraperitoneal de CCl_4 (Mion F, Geloen A,
- 5 Agosto E, And Minaire Y. Carbon Tetrachoride-Induced Cirrhosis in Rats: Influence of the Acute Effects of the Toxin on Glucose Metabolism. Hepatology 1996, vol. 23, No. 2:582-587); y b) ligadura del conducto biliar (LCB), en el que se observa una cirrosis franca después de la semana 4 de
- 10 la intervención quirúrgica (Lee SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, and Lebec D. Hemodynamic Characterization of Chronic Bile Duct-Ligated rats; effect of Pentobarbital Sodium. Am Journal Physiol 1986; 251:176-180; Nakano S, Harakane J, and Hasimoto H. Alteration in Bile ducts
- 15 Peribiliary Microcirculation in Rats After Common Bile Duct Ligation. Hepatology, 1995, Vol. 21, No. 5 1380-1395; Dumaswala R, Berkowitz D, And Heubi JE. Adaptive Response of the Enterohepatic Circulation of Bile Acid to Extrahepatic Cholestasis Hepatology, 1996, Vol. 23, No. 3:623-629 y Pod J.
- 20 L., Estanes A., Pedraza-Chaverri J., Cruz C., Perez C., Huberman A. y Uribe M.: Cronología de la hipertensión portal, disminución de excreción de sodio y activación del sistema Renina-Angiotensina en cirrosis biliar experimental. Rev. Invest. Clin. 49:15-23, 1997). Se administró al mismo tiempo
- 25 y con el mismo lote de Ad5 β gal a ratas controles sin

cirrosis. Se sacrificaron ratas de 5 y 8 semanas de intoxicación con CCl₄ y ratas de 2 y 4 semanas de LCB, 72 hrs después de la administración del AdR para el análisis histológico y determinar la expresión de la proteína β-galactosidasa (β-gal) codificada por el AdR, para este fin se extrajeron hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones y cerebro, se cortaron secciones de tejido en forma de cubos de 5-6 mm, los cuales fueron embebidos en el medio para congelar Tissue-Tek O.C.T., los tejidos se congelaron a -30°C y se cortaron con un criostato para obtener secciones de 8μm.

Estos cortes se colocaron en laminillas de vidrio silanizadas y fijadas con formalina equilibrada a pH 8.5, durante 15-30 min y se expusieron al reactivo X-gal por 16-18 hrs contratiñéndose con el colorante rojo neutro (Weiss DJ, Ligitt D, and Clark JG. In situ Histichemical Detection of β-Galactosidase Activity in Lung: Assesment of X-gal Reagent in Distinguishing lacZ Gene Expression and Endogenous β-Galactosidase Activity. Human Gene Therapy September 1, 1997, 8:1545-1554). El porcentaje de células positivas fue determinado por análisis morfométrico en campos múltiples del mismo tamaño y calculando el promedio. También se realizaron cortes de los hígados de las ratas con cirrosis, los que se embebieron en parafina, se cortaron y se tiñeron con rojo sirio, el rojo sirio tiñe específicamente proteínas colagénicas (Armendariz-Borunda J, and Rojkind M. A Simple

Quantitative Method for Collagen Typing in Tissue Samples:
Its Application to Human Liver with Schistosomiasis.
Collagen Rel. Res. 1984, Vol. 4:35-47). Con esta técnica
podemos verificar el grado de fibrosis y al aumento de ductos
5 biliares de una forma clara en el parenquima hepático. Para
verificar la transducción de células *in vivo* con la GFP,
utilizamos ratas Wistar sanas, a las cuales se les administró
el vector pAdGFP-MMP8, 72 hrs, después se realizó una
laparatomía media y se visualizaron los órganos expuestos en
10 el microscopio de fluorescencia, cerrando la herida después
para mantener vivo al animal.

Los resultados previos que aquí se presentan acerca
del estudio de la fisiopatología de la cirrosis hepática
experimental, pueden ser resumidos en la figura 2. Dicha
15 figura esquematiza la participación de citocinas pro-
inflamatorias y pro-fibrogénicas producidas *in vivo* por las
células de Kupffer, las cuales activarán en turno a las
células estelares hepáticas para que produzcan colágenas en
exceso y sean depositadas en el espacio subendotelial,
20 obstruyendo el recambio entre hepatocitos y sinusoides
(Armendáriz-Borunda J., Katayama K. and Seyer J.M.:
Transcriptional mechanisms of type I collagen gene expression
are differentially regulated by IL-1 β , TNF α and TGF β into
cells. J. Biol. Chem. 267:14316-14321, 1992; Armendáriz-
25 Borunda J., Katai H., Jones C.M., Seyer J.M., Kang A.H. and

Raghow R.: Transforming growth factor B is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration following CCl₄ treatment. Laboratory Investigation. 69:283294, 1993 y Armendáriz-Borunda J., Roy N., Simkewich C.,

5 Raghow R., Seyer J.M. and Kang A.H.: Activation of Ito cells involves regulation of AP1 binding proteins and induction of type I collagen gene expression. Biochemical Journal 304:817-824, 1994). El grado de incorporación del gen Lac-Z en células en cultivo contrastó visiblemente al comparar las

10 técnicas de fosfato de Calcio, complejos de ADN-Polilisina-Lactosa y con el vector adenoviral recombinante en HepG2 y MPR (macrófagos peritoneales de ratón) siendo el grado de transducción con adenovirus de un 100% y con las otras dos técnicas aproximadamente 1% como se muestra en la figura 5.

15 La figura 6, muestra la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células en cultivo. A) Macrófagos peritoneales de ratón transducidos con el vector adenoviral pAdGFP-MMP8, 72 hrs después de su administración (50X), B) células HepG2 transducidas con el vector adenoviral pAdGFP-

20 MMP8, 72 hrs después de su administración (50X) y C) células HepG2 sin el vector adenoviral. Todas las imágenes fueron tomadas en un microscopio estereoscópico de fluorescencia. Cabe señalar que en el revelado de la actividad de β -galactosidasa, las células tienen que ser fijadas y mueren,

25 en el ensayo de la GFP, las células siguen intactas y vivas.

En la figura 7, la expresión de la β -gal en diferentes órganos después de la infusión con Ad5 β gal vía vena iliaca. Se utilizó la fijación, lavado y soluciones de X-gal a diferentes pHs para discriminar entre la expresión endógena y 5 la β -galactosidasa bacteriana exógena. En la figura A se utilizó un pH de 7.0 y en la figura B el pH fue de 8.5, esto resume los resultados de los ensayos de las diferentes condiciones experimentales y pueden apreciarse que la exposición de tejidos a la solución de X-Gal a pH 8.5, nos 10 permitió eliminar la expresión de β -galactosidasa endógena.

Realizamos cortes por congelación de los siguientes órganos: hígado, riñón, pulmón, corazón, cerebro y bazo de ratas sanas e intoxicadas con CCl₄ por cinco y ocho semanas, como se representa en la figura 8, las gráficas nos muestran 15 claramente como el principal órgano blanco es el hígado, tanto en ratas sanas como en ratas con administración crónica de CCl₄. A), cinco semanas de administración del CCl₄ y B), ocho semanas de administración del CCl₄. El bazo y el pulmón presentan un grado de transducción menor al 1% por lo que en. 20 las gráficas es muy poco notorio; a las cuales se les administró una dosis de 3×10^{11} PV/ml (partículas virales por mililitro) del vector Ad5 β Gal. Las ratas controles sanas presentan un total del 70% de hepatocitos transducidos, además del hígado, el bazo y el pulmón presentan menos de 1% 25 de transducción, en los demás órganos no se encontró

transducción. También se realizaron cortes por congelación de los mismos órganos de ratas sanas y de ratas con dos y cuatro semanas de LCB, ver en la figura 9, las representaciones gráficas que nos muestran claramente como el principal órgano blanco es el hígado, tanto en ratas sanas como en ratas con ligadura del conducto biliar (LCB). A), dos semanas de LCB y B), cuatro semanas de LCB. El bazo y el pulmón presentan un grado de transducción menor al 1% por lo que en las gráficas es muy poco notorio. Con una dosis de 3 $\times 10^{11}$ PV/ml del vector Ad5 β Gal. Las ratas con LCB presentan un total del 10% de hepatocitos transducidos, además del hígado, el bazo y el pulmón presentan menos de 1% de transducción, en los demás órganos no se encontró transducción. En la figura 10 se muestran los resultados histológicos con el modelo de cirrosis hepática inducida por administración crónica de CCl₄, en donde A) representa un corte de hígado de una rata normal 72 hrs después de administración del Ad5 β Gal vía vena iliaca (un corte representativo de los experimentos de un total de cinco ratas). Más de 70% de los hepatocitos son positivos a la expresión de β -gal (200X); D) el mismo hígado como en la figura A) pero fueron teñidos con Rojo Sirio para observar la síntesis y depósito de colágena (200X); B) hígado con cinco semanas de intoxicación crónica con CCl₄. Aproximadamente 30-40% de los hepatocitos fueron transducidos exitosamente;

E) los mismos hígados como en B) pero teñido con Rojo Sirio, el aumento de la cantidad presente de colágena es notable y la arquitectura empieza a distorsionarse (200X); C) hígado de ratas después de ocho semanas de intoxicación crónica con CCL_4 donde se ha establecido una cirrosis típica, de nuevo, más del 40% de células hepáticas fueron positivas a la expresión de β -gal y F) los mismos hígados como en C) pero teñidos con Rojo Sirio. Una característica muy importante es la presencia de gruesos septos de colágena que se forman entre las venas centrales y del tracto portal (200X). En la figura 11, se muestran los resultados obtenidos en el modelo de cirrosis inducida por ligadura del conducto biliar (LCB). A) muestra un corte de hígado de una rata normal 72 hrs después de administración del Ad5 β Gal vía vena ilíaca (un corte representativo de los experimentos de un total de cinco ratas), más de 70% de los hepatocitos son positivos a la expresión de β -gal (200X); D) el mismo hígado como en A) pero se tiñeron con Rojo Sirio para observar la colágena (amplificación 200X); B) hígado de ratas después de dos semanas de LCB, el ensayo de β -gal se realizó 72 hrs después de la administración del Ad5 β Gal vía vena ilíaca. Aproximadamente 10% de los hepatocitos fueron transducidos exitosamente con el gen reportero; E) los mismos hígados como en B) pero teñidos con Rojo Sirio. La arquitectura empieza a distorsionarse debido a la fibrosis inducida por la

colestasis, así como el aumento considerable del número de ductos biliares (200X); C) hígado de ratas después de cuatro semanas de LCB para producir cirrosis, el ensayo de β -gal se realizó 72 hrs después de administración del Ad5 β Gal vía vena 5 iliaca. Nuevamente, 10% de los hepatocitos fueron transducidos exitosamente y F) los mismos hígados de C) pero teñidos con Rojo Sirio. Nótese el abundante depósito de proteínas de colágena y la gran proliferación de ductos biliares (200X). En la figura 12 se muestra una laparatomía 10 media de una rata Wistar sana a la que se le administró el vector pAdGFP-MMP8, se observa claramente la expresión de la GFP en el hígado y en cantidades insignificantes en el bazo. Un hecho importante es que la inyección de los vectores adenovirales NO indujo toxicidad letal en ninguno de los 15 animales de experimentación tanto sanos como controles.

La manera preferida de aplicar la presente invención, es mediante el suministro vía endovenosa de los vectores adenovirales recombinantes de la invención o de la composición farmacéutica que los contiene, en donde se proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva con un régimen de dosis unitaria conveniente a un individuo que padece de fibrosis, dicho régimen se puede ajustar de conformidad con el grado de aflicción. Generalmente, se emplea una dosis unitaria de aproximadamente 10^7 - 10^{14} 20 partículas virales por individuo.

La preparación de una composición farmacéutica que incluya a los vectores adenovirales recombinantes de la invención, se puede llevar a cabo mediante el empleo de técnicas estándares bien conocidas por los expertos en la materia en combinación con cualesquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en el estado de la técnica, incluyendo pero no limitando el almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina de trigo, tiza, sílica-gel, estearato de magnesio, estearato de sodio, talco de monoestearato de glicerilo, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Estas composiciones toman la forma farmacéutica de soluciones, suspensiones, tabletas, pastillas, cápsulas, polvos y formulación de liberación prolongada y los similares.

La descripción anterior y los siguientes ejemplos tienen como propósito el ilustrar modos particulares de llevar a cabo la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de protección de la misma.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1

METODOLOGIA para demostrar la actividad de Metaloproteasa o Colagenasa (MMP-8) y asimismo regular su función

a) Cultivo celular

Se cultivaron a las células HepG2, una línea celular

de origen parenquimatoso provenientes de hepatoma humano, en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro a 37°C en una atmósfera húmeda con aire al 95% y CO₂ 5% en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM L-glutamax y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina).

b) Vectores de expresión de los genes latente y activo de la MMP-8

Se utilizaron plásmidos con dos tipos de genes de la MMP-8 para transfectar a las células hepáticas: el plásmido pcDNA-MMP8 que contiene al cDNA que codifica a la MMP-8 latente (pro-MMP-8) junto al promotor viral fuerte del citomegalovirus (CMV) y el plásmido pcDNA3-MMP8 que contiene al cDNA que codifica a la MMP-8 activa junto al promotor de CMV. Este último se creó por subclonación a partir de los plásmidos pcDNA3 y PETIIa-HNC cortando con las enzimas de restricción *Bam*H I y *Xba*I e insertando el producto de PCR codificante del dominio catalítico de la MMP-8 (la cual carece de los fragmentos propéptido y carboxilo terminal), como se representa en la figura 13, el envío de genes de MMP8 latente y activa. Dos tipos de plásmidos, con el gen de la MMP8 fueron utilizados para su envío a las células hepáticas en cultivo: 1) pcDNA3-MMP8, plásmido con el fuerte promotor viral del citomegalovirus (CMV) y el cDNA que codifica a la colagenasa en su forma.

Como gen reportero se utilizó el plásmido pSV₂-β gal,

el cual tiene insertado el gen que codifica a la enzima β-galactosidasa adyacente al promotor del virus de SV40.

5 c) Transformación, amplificación y purificación de plásmidos

Para obtener una cantidad suficiente de cada uno de los plásmidos a utilizar en los diferentes ensayos, se les introdujo a bacterias *E. coli* de la cepa DH5αTM (proceso conocido como transformación) conforme a lo indicado en el 10 protocolo del proveedor de estas células competentes (Life Technologies, Gaithersburg, MD): en un tubo de reacción se utilizaron 50 μl de la cepa competente DH5α al que se le adicionó 2 μl de plásmido (1-10 ng DNA), después de mezclarse se incubó en hielo durante 30 min y posteriormente se les 15 aplicó un choque térmico a 37°C durante 20 seg e inmediatamente se colocó en hielo durante 2 min, al cabo de este tiempo se le adicionó 0.95 ml del medio de cultivo bacteriano Luria Base (LB) y se agitó a 225 rpm por 1 h a 37°C para la expresión del plásmido. Despues de la expresión 20 se tomó 50 μl de la mezcla de reacción para sembrar una placa de cultivo de agar LB con 100 μg/ml de ampicilina y se incubó a 37°C durante una noche. Las colonias que crecen después de este período son aquellas que contienen el plásmido de interés el cual les confiere la capacidad de resistencia al 25 antibiótico.

Para amplificar la cantidad del plásmido se tomaron de la placa de agar un par de colonias para cultivarlas en 1 L de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina durante 24 h a 37°C con agitación constante a 225 rpm. Una vez que la densidad óptica del cultivo es ≥ 0.6 se centrifuga a 6,000 rpm durante 10 min para recolectar la pastilla bacteriana. De esta pastilla de bacterias se aisló el ADN plasmídico del ADN genómico de la bacteria utilizando un kit de purificación de plásmidos (Monster-prep, BIO101, Vista, CA) el cual se basa en la lisis alcalina de la pared bacteriana, la liberación del plásmido de su interior y la separación de este ADN por medio de una resina particular. La cuantificación del ADN plasmídico se realizó midiendo espectrofotométricamente la absorbancia resultante a $\lambda=260$ nm.

15 d) Transfección de células en cultivo

Uno de los métodos que más se utilizan para la introducción de genes a células eucarióticas es la transfección de ADN con fosfato de calcio, en la cual el ADN exógeno se deposita como un precipitado fino sobre la superficie de la célula, para posteriormente ser incorporado por ella e integrado transitoriamente en el ADN cromosomal. Para dirigir el ADN con mayor selectividad hacia las células hepáticas se utiliza el envío de ADN en forma de complejo con polilisina-lactosa, dada la característica de que dichas células poseen un receptor específico de galactosa en su

superficie.

Para ello, se cultivaron las células HepG2 a aproximadamente un 70-80% de confluencia para su transfección con los plásmidos pcDNA-MMP8, pcDNA3-MMP8, y pSV₂-β galactosidasa. La transfección se hizo tanto por el método de precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1988) como por el de la formación de complejo con polilisina-lactosa (Martínez-Fong et al., 1994). En breve: a las células en cultivo se les adiciona el precipitado recién formado, producto de la adición al ADN plasmídico de una solución de CaCl₂ 2M y una solución de buffer HEPES pH 7.12 para el caso de la transfección con fosfato de calcio, o bien se le adiciona el complejo de ADN con polilisina-lactosa. Se incuban las células de 4 a 16 horas para permitir que el precipitado se adhiera a la superficie celular y posteriormente el ADN sea endocitado e ingrese transitoriamente al núcleo, al término de este tiempo el medio de cultivo es cambiado por uno fresco, ver figura 14, en donde se cultivó la línea celular hepática HepG2 en medio DMEM con 10 % de suero fetal bovino. Al presentar un 60-80% de confluencia se le adicionó al medio de cultivo 10 mg del plásmido con el gen de la MMP-8, tanto en su forma latente como en la activa o madura. A la vez se les envió el gen procariótico de β-galactosidasa (β-gal) para monitorear la eficiencia de la incorporación y expresión. El gen de

MMP-8 fue enviado en diversas formas: desnudo, en complejo con CaPO₄ o en complejo con polilisina-lactosa.

e) Formación de los complejos polilisina-lactosa y ADN:polilisina-lactosa (ADN:PL)

El complejo de polilisina-lactosa se forma al reaccionar 14.8 mg de poli-L-lisina (0.1N) con 200 µl de α-lactosa 0.5N (relación lactosa-polilisina: 1.0N), después se le adiciona 20 mg del agente reductor cianoborohidruro de sodio 3M y se incuba a 37°C por 48 h con agitación constante a 225 rpm. Al término de este tiempo se hace pasar la mezcla de reacción a través de una columna desaladora (Biorad 10-DG) previamente acondicionada con solución buffer de fosfatos (PBS pH 7.2) a la que se eluye con este mismo buffer. A las fracciones eluidas se les determina el contenido de carbohidratos por el método de DuBois (1956) para analizar el grado de lactosilación del complejo y el contenido de polilisina según el método de Shen y cols., (1984) el cual se toma como base para evaluar la concentración final del complejo PL. La fracción con mayor concentración de PL es utilizada para su posterior reacción con el ADN del plásmido con el gen de interés como se muestra en las figuras 14 y 16.

Para evaluar la relación molar óptima de ADN:PL a utilizar en los ensayos de transfección se hizo reaccionar el ADN con diversas concentraciones de PL. Al término de 1 h de incubación se aplicaron las muestras a un gel de

retardamiento de agarosa al 1.0% y se somete a electroforesis de ADN (60mV, 1.5h), en el que el complejo de ADN:PL con mayor contenido de PL recorre una menor distancia en comparación a la recorrida por el plásmido libre (0% de retardamiento). Se utilizó la relación de ADN:PL que provocaba un 80-90% de retardamiento de la migración, como se muestra en la figura 16, la incorporación y expresión de los genes exógenos de β -galactosidasa y pcDNA-MMP8 enviados a las células en complejos con CaPO₄ y polilisina-lactosa.

10 f) Ensayos de expresión transitoria usando el sistema reportero de β -galactosidasa (β -gal)

Este sistema determina la actividad de la enzima β -galactosidasa como una medida del nivel de expresión del gen de interés transfectado conjuntamente con el gen que codifica para esta enzima. La β -galactosidasa es una enzima bacteriana que cataliza la conversión del sustrato incoloro X-gal a un producto de coloración azul. Debido a ello, la actividad de β -galactosidasa observada en células eucarióticas sometidas a transfección indicará la exitosa 20 incorporación del gen de interés asociado al gen bacteriano.

El ensayo de β -gal para la tinción de células en las cajas de cultivo consiste en la fijación de las células a 4°C por 5 min con p-formaldehido 2%, el subsecuente lavado con PBS (3X) y la adición de 1 ml de una solución de tinción de 25 PBS contiendo ferricianuro de potasio 20mM, ferrocianuro de

potasio 20mM y cloruro de magnesio 2mM, seguido de la adición del sustrato X-gal a una concentración final de 0.5 mg/ml. Después de incubar a 4°C durante toda la noche (18 h) se identifican bajo el microscopio las células de coloración azul (Ausubel, 1995).

g) Extracción de ARN

A las 48 hrs de la transfección se recolectaron las células para realizar la extracción del ARN por el método de Chomczynski y Sacchi (1987) utilizando el reactivo de Trizol® como a continuación se describe: a cada una de las cajas se le adicionó 1 ml de solución PBS y se recolectaron las células por raspado de la caja para transferirlas a un tubo eppendorf; posteriormente se centrifugó a 1,000 rpm por 1 min y a la pastilla celular se le adicionó 500 µl de Trizol, se procedió a su homogenización e inmediatamente a su incubación por 5 min a 4°C. Se agregaron 100 µl de cloroformo y se incubaron durante 5 min a 4°C. Después de este tiempo se centrifugó a 12,000 g durante 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa (superior) a otro tubo a la cual se le adicionó la misma cantidad en volumen de isopropanol y se incubó a -70°C durante 15 min para precipitar el ARN extraido. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 15 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante decantando y secando el tubo con papel limpio y estéril. Se le adicionó 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 12,000 g durante 10 min a 40°C.

Finalmente se resuspendió la pastilla con 20-50 μ l de agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato y se cuantificó la concentración de ARN obtenida en un espectrofotómetro a una longitud de onda λ de 260 mn.

5 h) Análisis de la expresión del gen de la MMP-8 por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a la reacción de transcriptasa reversa (RT)

Para determinar el grado de expresión del gen exógeno de la MMP-8 incorporado en las células se realizó la obtención del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN previamente extraído y posteriormente se llevó a cabo la amplificación de la señal de expresión a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

Para la obtención del ADNc se utilizó el siguiente procedimiento: 2 μ g de ARN total se llevaron a un volumen de 8 μ l con agua desionizada estéril y se incubó a 70°C durante 10 min. Seguido de esto se agitó la muestra en agua con hielo durante 5 min y en hielo, se adicionaron los siguientes reactivos: 4 μ l buffer 5X para la enzima RT, 4 μ l dNTP's mix 2.5 mM, 1 μ l random primers (1 μ g/ μ l), 1 μ l inhibidor de ARNasa (1U/ μ l) y finalmente 2 μ l de la enzima transcriptasa reversa (200 U/ μ l). Se incubó la mezcla de la reacción a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente a 37°C durante 1 hr. Al término de este tiempo, se colocó inmediatamente a una temperatura de 95°C durante 10 min y

finalmente se colocó en hielo con agua durante 5 min con agitación constante y se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

Para analizar la expresión específica del gen de la MMP-8 se realizó la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los primers u oligonucleótidos específicos para este gen según las condiciones experimentales que a continuación se describen: en un tubo de reacción con 2 μ l de ADNc se adicionaron 5 μ l MgCl₂ 2.5 mM, 5 μ l buffer 5X para la enzima polimerasa proveniente del virus de leucemia murina de Moloney (MMV), 2 μ l dNTPs 2.5 mM, 5 μ l del oligonucleótido sentido 3 μ M, 5 μ l del anti-sentido 3 μ M, 1 μ l de la enzima polimerasa (1 U/ μ l) y se lleva a un volumen final de 50 μ l con agua desionizada (Innis y cols., 1990). El oligonucleótido sentido específico para la MMP-8 es 5'-AGCTGTCAGAGGCTGGAGGTAGAAA-3', y el antisentido es 5'-CCTGAAAGCATAGTT GGGATACAT-3' (Cole y cols., 1996). Después de la adición de estos reactivos, se colocó la mezcla en un termociclador durante 30 ciclos de acuerdo con el siguiente programa: desnaturización (94°C, 5 min), alineación (60°C, 1 min) y extensión (72°C, 1.5 min). Al término de este tiempo, los productos de PCR son sometidos a electroforesis (60mV, 1.5 h) en un gel de agarosa al 1.5%.

i) Ensayo de actividad de colagenasa

El análisis de la actividad enzimática de la colagenasa se realizó para determinar la funcionalidad de la

enzima producida, ya que esta proteína pudiera encontrarse enzimáticamente inactiva, lo que no se podría conocer a través de la determinación única del ARN que la codifica.

Después de 24 h de mantener a las células en cultivo con 5 medio libre de suero, el medio de cultivo se recolecta y se determina en éste la actividad de colagenasa secretada por las células por un método modificado de Hasty y cols., (1986) sometiendo a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% para identificar los productos de degradación.

10 Brevemente: los sobrenadantes celulares conteniendo 1-1.5 µg de proteína fueron incubados a 27°C durante 18 hrs con 5 µg de colágena nativa tipo I y 60 µl del buffer de incubación: 50mM de Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, 50 mM de arginina, Triton X-100 1% y en ausencia o presencia de 1mM 15 APMA, pH 7.6. Finalmente se mezclaron 30 µl del producto de reacción con 30 µl de buffer de muestra para proteínas y se corrió la electroforesis de poliacrilamida desnaturizante al 7.5% para identificar los productos de degradación $\alpha 1^A$ y $\alpha 2^A$ de la colágena tipo I.

20

Ejemplo 2

RESULTADOS para demostrar la actividad de Metaloproteasa o Colagenasa (MMP-8) y asimismo regular su función

La subclonación permitió incorporar el ADN complementario de la MMP-8 que codifica para la enzima 25

completamente funcional en un vector apropiado a nuestras necesidades. Así, en la figura 15, se muestra la electroforesis de los fragmentos de DNA liberados al cortar los plásmidos de MMP-8 con enzimas de restricción. Carril: 5 A) marcador de pares de bases de ADN 1 kb ladder (Gibco BRL); B) Perfect DNA marker (Novagen, Inc.); 1) pcDNA-MMP8 cortado con BamHI y XbaI; 2) pcDNA3-MMP8 cortado con BamHI y XbaI; C) φX174 marker (Gibco BRL); λ HindIII marker (Gibco BRL), en donde los ADNc de la MMP-8 latente (carril 1) y la MMP madura 10 (carril 2) fueron exitosamente subclonados en los vectores de expresión pcDNA y pcDNA3. Se observan claramente los insertos liberados con enzimas de restricción BamHI y XbaI. Las bandas teñidas con bromuro de etidio corresponden a cada uno de los ADNc comprendidos entre 506 y 560 pares de bases 15 (pb) aproximadamente, para los ADNc de la MMP madura y latente, respectivamente.

Para evaluar la eficiencia de la incorporación del ADNc de la MMP-8 enviado a las células HepG2 en forma de complejo con CaPO₄ y con polilisina-lactosa, se realizó la 20 co-transfección de este plásmido junto con el del gen reportero de β-galactosidasa. De esta forma, las células que se observan bajo el microscopio con coloración azul indican indirectamente que también han incorporado al plásmido de interés. La figura 16 nos muestra la expresión de β-galactosidasa en las células HepG2 co-transfectedas con el 25

plásmido libre, en forma de complejo CaPO₄ o en su forma de complejo con polilisina-lactosa. Esta figura nos muestra que el acoplamiento del ADN con polilisina-lactosa se llevó a cabo, dado que a mayor concentración de polilisina se observó un claro retardamiento del plásmido de β-galactosidasa. La relación seleccionada para transfectar las células fue aquélla que retardó el 80% de la migración del plásmido.

Una vez demostrado que las células en cultivo son capaces de incorporar y expresar genes que les han sido transfectados fue necesario corroborar que dichos genes eran transcritos por la maquinaria de las células huésped mediante los ensayos de RT-PCR. La figura 17, nos muestra un análisis mediante la reacción en cadena de la polimerasa asociada a la transcriptasa reversa (RT-PCR) de los ARNm de las MMP8 y MMP13. (Este plásmido fue utilizado como otro control positivo de transfección); en donde una electroforesis de ADN de los productos amplificados de PCR del ADNc de la MMP-8 enviado en su forma de complejo con CaPO₄ y polisina-lactosa ha sido transcrita para ambos casos en las células HepG2 transfectadas. Se observa que la señal de los productos de PCR de la MMP8 (359 pb) fue más intensa cuando el plásmido fue enviado en complejo con polilisina-lactosa.

Para demostrar que el transcrito de MMP-8 expresado por las células HepG2 era traducido en una proteína funcional se realizó el ensayo de actividad enzimática utilizando

colágena tipo I como sustrato. La figura 18, muestra la actividad enzimática de degradación de colágena tipo I de la proteína secretada al medio, que fue observada en las células transfectadas con el gen de la MMP8 latente, previa activación con el agente mercurial APMA (carril 7) y con el gen de la MMP8 activa en su complejo con CaPO₄ (carril 9) y con polilisina-lactosa (carril 10), y su inhibición específica con EDTA 2mM. Controles negativos: colágena tipo I sin adición de sobrenadantes de células (carril 1) y con la adición de tripsina (carril 3), colágena con sobrenadantes de células sin transfectar (carril 2). Carriles positivos: colágena tipo I con sobrenadante de leucocitos humanos (carril 3), colágena tipo I con adición de colagenasa bacteriana al 0.015% (carril 4); así como los productos de la degradación de la colágena nativa tipo I separados en un gel de poliacrilamida al 8% después de haberse incubado con el sobrenadante de las células transfectadas con el gen de la MMP-8 latente y activa. Se observa como en ambos casos se presenta la actividad colagenolítica en presencia del agente organomerkurial APMA para el caso de la primera y su inhibición por EDTA para ambos casos, lo que indica que esta actividad proteolítica corresponde a una metaloproteasa de matriz intersticial. La incubación de la colágena nativa tipo I con tripsina no mostró degradación. Por lo tanto, este experimento demuestra claramente que la acción de la

MMP-8 fue específica dada la naturaleza intacta de la molécula de colágena.

La figura 19, muestra la evidencia de que la actividad de las enzimas que degradan específicamente 5 colágenas pueden ser controladas (apagadas y/o prendidas) mediante la clonación de sus cDNAs respectivos que a su vez se encuentran bajo el control transcripcional de genes regulables como el PEPCK (phosphoenol-piruvate carboxikinase). Es claro ver que tanto la estimulación de 10 las células en cultivo con Glucagón (carriles 5 y 6) como cAMP (carriles 7 y 8) sobreestimulan la producción del RNA mensajero que codifica para MMP-8, así como que la Insulina disminuye dicha producción (carriles 9 y 10).

Las observaciones en la actividad de β -galactosidasa 15 endógena sugiere que esta actividad tiende a ser granular y más débil en color que el colorido azul denso que es el resultado de la actividad de la enzima exógena (Shimohama S., Rosenbergh M.B., Fagan A.M., Wolff J.A., Short M.P., Brakfielf XO, Friedman T. and Gage F.H.: Genetically 20 modified cells into the rat brain: Characteristics of *E. coli* -galactosidase as a reporter gene. Brain Res. 5:271-278, 1989). Se han descrito muchas modificaciones para aumentar la especificidad en el ensayo para la determinación del gen lac-Z exógeno. Así, según los datos previamente reportados 25 por Weiss DJ, Ligitt D, And Clark JG. In Situ Histochemical

Detection of β -Galactosidase Activity in Lung. Assessment of X-gal Reagent in Distinguishing lacZ gene Expression and Endogenous β -Galactosidase Activity. Human Gene Therapy September 1, 1997, 8:1545-1554; en la presente invención se 5 utilizó una solución de X-Gal a un pH estable de 8.5, de esta forma, se demostró la actividad de la β -Gal exógena mientras se minimizó la actividad endógena *in vivo*.

Uno de los indicadores que actualmente se utilizan para monitorear *in vivo* la eficiencia y localización de las 10 células transducidas con adenovirus recombinantes es la detección en la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). Para esto, el gen que codifica a esta proteína se subclona en los vectores adenovirales de forma tal que mediante el empleo de un microscopio fluorescente, se puede 15 observar la fluorescencia directamente sin sacrificar al animal de experimentación, al cual se le administró el vector (Rojas-Martinez A., Wyde P.R., Montgomery C.A., Chem S-H., Woo SLC and Aguilar-Cordova E.: Distribution toxicity and lack of replication of an ElA-recombinant adenoviral vector 20 after systemic delivery in the cotton rat. Cancer Gene Ther. 1998 y TongChuan H., Shibin Z., Luis T., Jian Y., Kenneth W. and Vogelstein Bert: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 95:2509-2514, March 1998). Se han obtenido muchos datos en 25 los que se demuestra que después de la administración de los

adenovirus en forma intravenosa en animales sanos, las principales células blanco fueron hepatocitos. Esta observación se ha mostrado en ratones, conejos, perros y primates (Zern AM, And Kresina TF. Hepatic drug delivery and gene therapy. *Hepatology* 1997 Vol. 25, No. 2, 484-491), pero no en ratas con cirrosis. La inyección en vena porta probablemente sea más eficaz para que llegue a las células blanco en el hígado proporcionando un inóculo favorable de partículas virales a todo el hígado antes de diluirse en la circulación periférica. Se ha mostrado que esta ruta es muy eficaz, pero el gran inconveniente es que se requiere hacer una laparatomía. Por otro lado, la administración peritoneal es una infusión más rápida y simple, pero no favorece la transducción de hepatocitos. Los resultados de la presente invención muestran que la inyección de 3×10^{11} partículas virales por vena ilíaca en ratas Wistar de aproximadamente 200 grs de peso, produce un nivel muy alto de expresión (70% de transducción de hepatocitos). Nuestros resultados son parecidos a un reciente informe que muestra en envío dirigido a hígado del gen reportero en primates vía vena safena, en el que se produce casi el mismo nivel de transducción y expresión del transgen en el hígado comparada con la infusión a través de la vena porta (Marie-Jean TFD, Poeters V, Lieber A, Perkins J, and Kay MA. Method for Multiple Portal Vein Infusions in Mice: Quantitation of Adenovirus-Mediated

Hepatic Gene Transfer. Biotechniques February 1996, 20:278-

285 y Zhu G, Nicolson AG, Zheng X, Strom TB, and Sukhame VP.

Adenovirus-Mediated β -Galactosidase Gene Delivery to the Liver Leads to Protein Deposition in Kidney Glomeruli.

5 Kidney International, 1997, Vol. 52, 992-999). Además la expresión del gen reportero en nuestros animales con cirrosis inducida por la administración crónica del CCl₄ fue sorprendentemente casi tan alta como los normales (40% de los hepatocitos transducidos). Estos resultados son muy
10 excitantes ya que nuestros animales con cirrosis difícilmente sobrevivirían al procedimiento quirúrgico exigido para poder administrar el adenovirus por vena porta. Esto debido a que las pruebas funcionales hepáticas, así como los Tiempos de Protrombina se encuentran muy elevados y el sangrado se
15 presentaría en forma importante. Aunque las ratas con ligadura del conducto biliar mostraron una reducción sustancial en el número de hepatocitos transducidos (de 5-10%), también es importante el número de hepatocitos, los cuales pueden ser transducidos con genes terapéuticos, como
20 las metaloproteasas (MMP-8) y/o genes que codifiquen para proteínas estimuladoras de regeneración hepática como uPA (urokinase Plasminogen Activator) y Smad7.

Debe ser evidente para aquellas personas expertas en la técnica que otras variaciones no dadas a conocer
25 específicamente en la presente invención, pero que, sin

embargo, se proponen mediante la presente y que se consideran
que quedan dentro del alcance y espíritu de este invento.

Por lo que la invención no debe quedar limitada mediante la
descripción de las modalidades específicas dadas a conocer,
5 sino únicamente mediante las siguientes:

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1.- Un vector adenoviral recombinante que comprende un genoma adenoviral del cual se han deletado los marcos de lectura abiertos E1 y/o E3, pero que retiene la secuencia suficiente para que dicho vector adenoviral sea capaz de replicarse in vitro. Adicionalmente dicho vector contiene un gen terapéutico o una secuencia de ADN de interés regulada por promotores ubícuos y/o promotores específicos de tejido, que codifica para proteínas terapéuticas útiles en el tratamiento de la fibrosis.

2.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde el promotor específico de tejido es PEPCK.

3.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde el gen terapéutico o la secuencia de ADN clonada en dicho vector adenoviral se selecciona del gen de la metaloproteasa MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; gen del activador de plasminógeno derivado de uroquinasa uPA silvestre y/o modificado; gen del receptor truncado tipo II de TGF- β y Smad7 que codifican para proteínas terapéuticas que degradan el exceso de proteínas colagénicas depositadas en los órganos cirróticos.

4.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 3, en donde el gen terapéutico es una secuencia de ADN que se selecciona del gen del factor de

crecimiento para hepatocitos HGF, que codifica para proteínas estimuladoras de regeneración hepática con la finalidad de restablecer las funciones normales del hígado.

5.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde las proteínas terapéuticas para el tratamiento de la fibrosis son la proteína MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; uPA silvestre y/o modificado; receptor truncado tipo II de TGF- β ; betaglycano; HGF y Smad7.

10 6.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además el envío de los genes terapéuticos o secuencias de ADN que codifican para proteínas terapéuticas para el tratamiento de fibrosis en los higados con cirrosis.

15 7.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 6, en donde el envío de los genes terapéuticos se lleva a cabo en otros órganos con fibrosis generalizada.

20 8.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 7, en donde el reconocimiento tejido-específico de los genes terapéuticos a los órganos con fibrosis se lleva a cabo por la vía de administración empleada.

25 9.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 8, en donde la vía de administración es endovenosa.

10.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 6, en donde los órganos con fibrosis se seleccionan de hígado, pulmón, corazón, riñón, piel y cicatrices hipertróficas.

5 11.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 10, en donde el principal órgano blanco es el hígado.

10 12.- Vectores recombinantes de conformidad con las reivindicaciones 1 a 11, en donde el envío de genes terapéuticos se lleva a cabo mediante el uso de vectores virales o no virales.

15 13.- El vector recombinante de conformidad con la reivindicación 12, en donde los vectores no virales se seleccionan de plásmidos y liposomas catiónicos y aniónicos.

14.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 6, en donde el envío eficiente del gen de la colagenasa MMP-8 al hígado cirrótico puede lograr la degradación de la colágena a través de la sobre-expresión de metaloproteasas.

20 15.- El vector adenoviral recombinante de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza para el tratamiento de la fibrosis hepática, pulmonar, renal, del corazón, keloides y cicatrices hipertróficas, el cual no induce toxicidad letal.

25 16.- Un proceso para preparar vectores adenovirales

recombinantes mediante la clonación de genes reporteros Lac-Z y GFP y el gen terapéutico, que codifica para proteínas terapéuticas para el tratamiento de la fibrosis hepática, pulmonar, renal, del corazón, keloides y cicatrices hipertróficas.

17.- El proceso de conformidad con la reivindicación 16, en donde el gen terapéutico se selecciona del gen de la metaloproteasa MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; gen del activador de plasminógeno derivado de uroquinasa uPA silvestre y/o modificado;

10 Smad7 y gen del receptor truncado tipo II de TGF-β.

18.- El proceso de conformidad con la reivindicación 16, en donde el vector adenoviral recombinante es pAdGFP-MMP-8.

19.- Una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva con un régimen de dosis unitaria de partículas virales de los vectores adenovirales recombinantes de conformidad con la reivindicación 1, para el tratamiento de la fibrosis hepática, pulmonar, renal, del corazón, keloides y cicatrices hipertróficas, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 20.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 19, en donde la dosis unitaria es de aproximadamente 10^7 - 10^{14} partículas virales por individuo que padece de fibrosis.

25 21.- El uso de vectores adenovirales recombinantes de conformidad con la reivindicación 1, para la elaboración de

un medicamento para el tratamiento de la fibrosis hepática,
pulmonar, renal, del corazón, keloides y cicatrices
hipertróficas.

5

10

15

20

25

A continuación se dan a conocer las definiciones de la simbología empleada en las figuras que corresponden a la presente invención, en donde:

Figura 1:

- 5 CEH = CELULA ESTELAR HEPATICA
- CES = CELULA ENDOTELIAL SINUSOIDAL
- CK = CELULA DE KUPFFER
- ESET = ESPACIO SUBENDOTELIAL
- HE = HEPATOCITOS
- 10 HIDC = HIGADO CON DAÑO CRONICO
- HIN = HIGADO NORMAL
- SINU = SINUSOIDE

Figura 2:

- 15 COLASA = COLAGENASA
- DCA = DEGRADACION DE LA COLAGENA
- TGE = TERAPIA GENICA EXPERIMENTAL
- MMPs = METALOPROTEASAS

20 Figura 3:

- CT 293 = COTRANSFECCION EN CELULAS 293
- PG CsCl = PURIFICACION CON GRADIENTES DE CsCl

Figura 4:

- 25 BD = BRAZO DERECHO

BI = BRAZO IZQUIERDO

CTBK = COTRANSFECTAR EN BACTERIAS Y SELECCION EN KANAMICINA

CUL = CULTIVAR

LI PacI = LINEARIZAR CON PacI

5 LI PmeI = LINEARIZAR CON PmeI

PV = PARTICULAS VIRALES

T 293 = TRANSFECTAR EN CELULAS 293

GENADR = GENERACION DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES

10 **Figura 7:**

B = BAZO

CE = CEREBRO

CO = CORAZON

%CT = % DE CELULAS TRANSDUCIDAS

15 H = HIGADO

P = PULMON

R = RIÑON

SAd β -Gal = SIN EL VECTOR Ad β -Gal

CAd β -Gal = CON EL VECTOR Ad β -Gal

20 X-GAL7 = REACTIVO X-GAL pH 7.0

X-GAL8.5 = REACTIVO X-GAL pH 8.5

Figura 8:

B = BAZO

25 CCl45 = 5 SEMANAS DE INTOXICACION CON CCl4

CC148 = 8 SEMANAS DE INTOXICACION CON CCl4

CE = CEREBRO

CO = CORAZON

%CT = % DE CELULAS TRANSDUCIDAS

5 H = HIGADO

P = PULMON

R = RIÑON

PV = PARTICULAS VIRALES

HN = HIGADO NORMAL

10

Figura 9:

B = BAZO

CE = CEREBRO

CO = CORAZON

15 %CT = % DE CELULAS TRANSDUCIDAS

H = HIGADO

LCB2S = 2 SEMANAS DE LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR

LCB4S = 4 SEMANAS DE LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR

P = PULMON

20 R = RIÑON

PV = PARTICULAS VIRALES

HN = HIGADO NORMAL

Figura 13:

25 Prot = PROTEINA

APMA = ACETATO AMINOFENIL MERCURICO

Figura 14:

ACT β -gal = ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA

5 CES = CELULAS

EAC = ACTIVIDAD ENZIMATICA

PL = POLILISINA

PROT = PROTEINA

RGAL = RESIDUOS DE GALACTOSA

10 SNAD = SOBRENADANTE

Figura 16:

ADND = ADN DESNUDO

GELRADN-PL = GEL DE RETARDAMIENTO PARA LA POLILISINA

15

Figura 18:

CA = CON APMA

CACE = CON APMA Y CON EDTA

CaPO₄ = FOSFATO DE CALCIO

20 CE = CON EDTA

COB = COLAGENASA BACTERIANA

COL1 = COLAGENA TIPO I

PL = POLILISINA

SA = SIN APMA

25 SNL = SOBRENADANTE DE LEUCOCITOS

ST = SIN TRANSFECCION

TRIP = TRIPSINA

Figura 20:

S %CT = % DE CELULAS TRANSDUCIDAS

PV = PARTICULAS VIRALES

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

Se propone el uso de terapia génica para su aplicación en el tratamiento de diversas fibrosis en humanos.

El objetivo es la utilización de genes "terapéuticos" específicamente dirigidos a órganos blanco para revertir y/o prevenir el desarrollo del proceso que cursa con fibrosis.

La potencial aplicación de terapia génica a pacientes con fibrosis y/o cirrosis dependerá en buena parte del envío exitoso de genes que codifiquen para proteínas terapéuticas a hígados con fibrosis extensa y que estos genes que codifiquen para proteínas MMP-8 latente y activa, MMP-1, MMP-2, MMP-9 y MMP-13; uPA silvestre y/o modificado(o su versión truncada); receptor truncado tipo II de TGF- β y Smad7 sean dirigidos por adenovirus y/o otros vectores recombinantes que no transduzcan (infecten) otros órganos de la economía. Los adenovirus recombinantes (AdR) son vectores altamente eficientes para la transducción de genes terapéuticos a diversas células blanco. Hemos probado que se pueden llevar genes a hígados cirróticos.

El envío de genes terapéuticos mediante dichos vectores adenovirales y otros vectores recombinantes se podrá realizar utilizando liposomas (DOTMA) catiónicos y aniónicos.

Asimismo, proponemos el uso de esta patente para que de igual manera sea aplicada a:

25 * Fibrosis renal,

- * Fibrosis pulmonar,
- * Cicatrices hipertróficas y keloides (Fibrosis de la piel) y
- * Otros tipos de fibrosis.

5

10

15

20

25

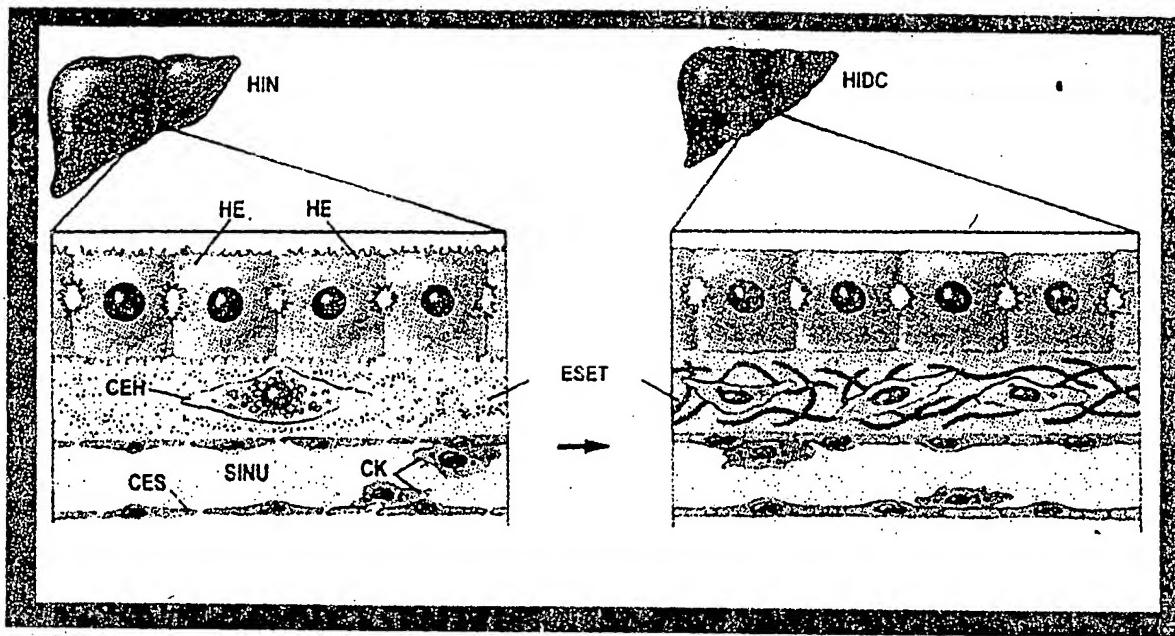


Figura 1

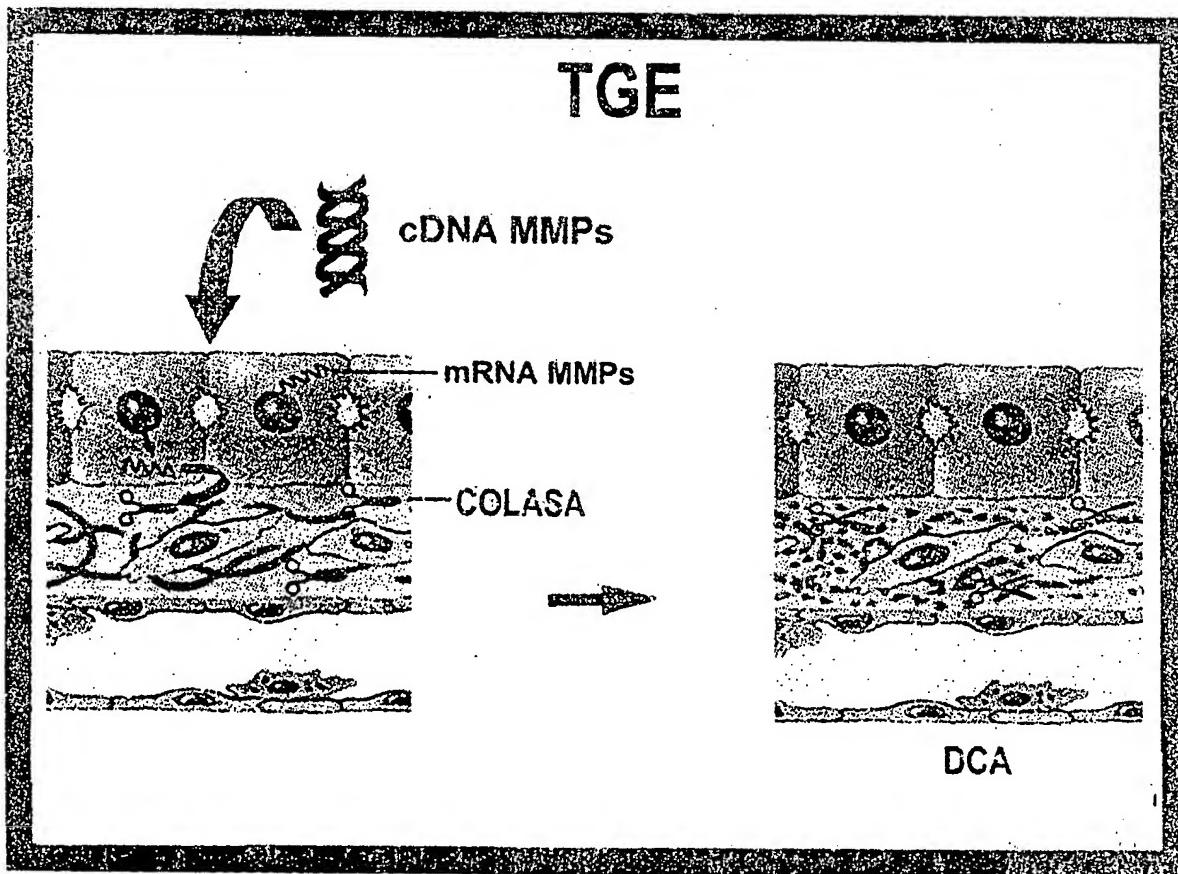


Figura 2

2/12

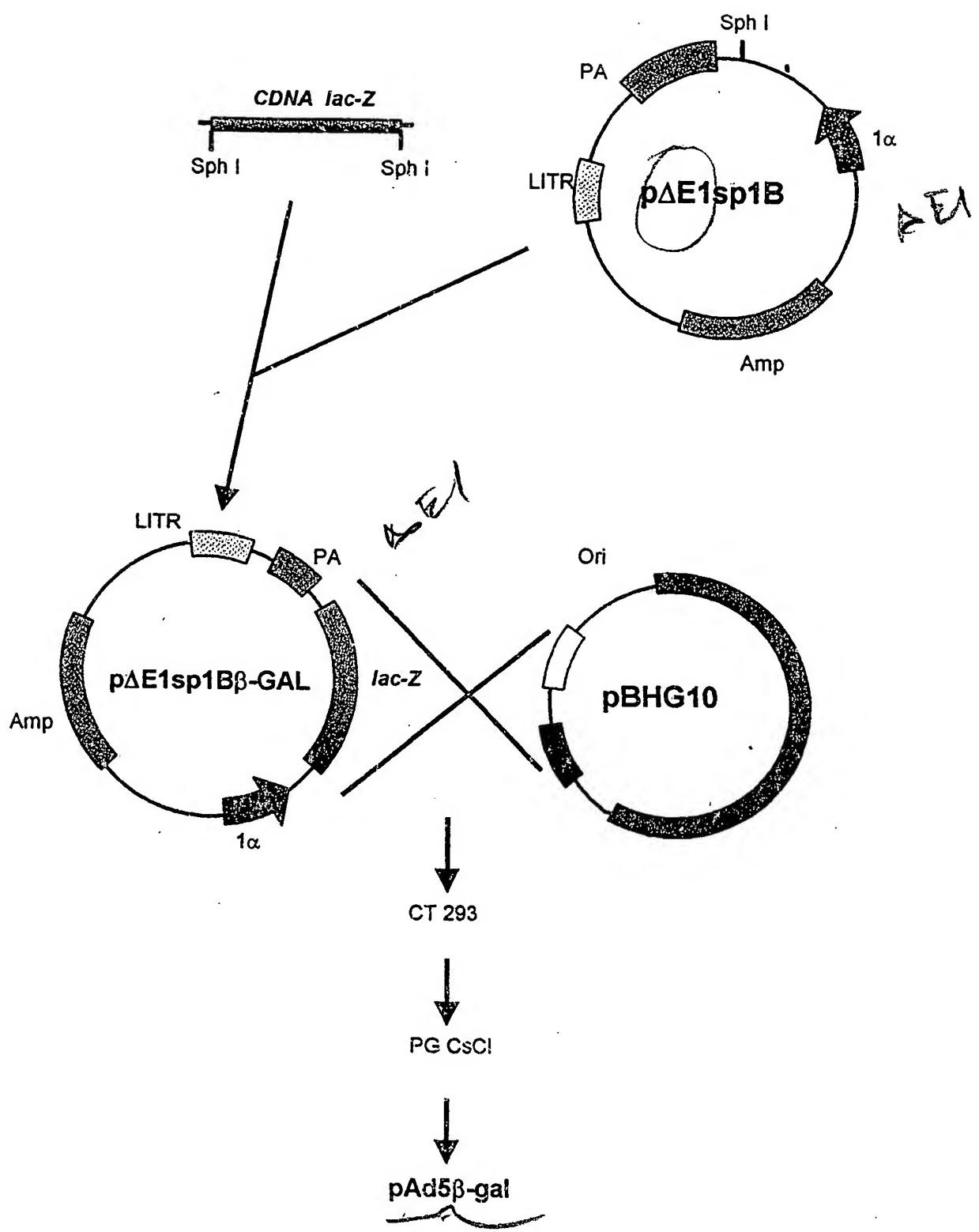
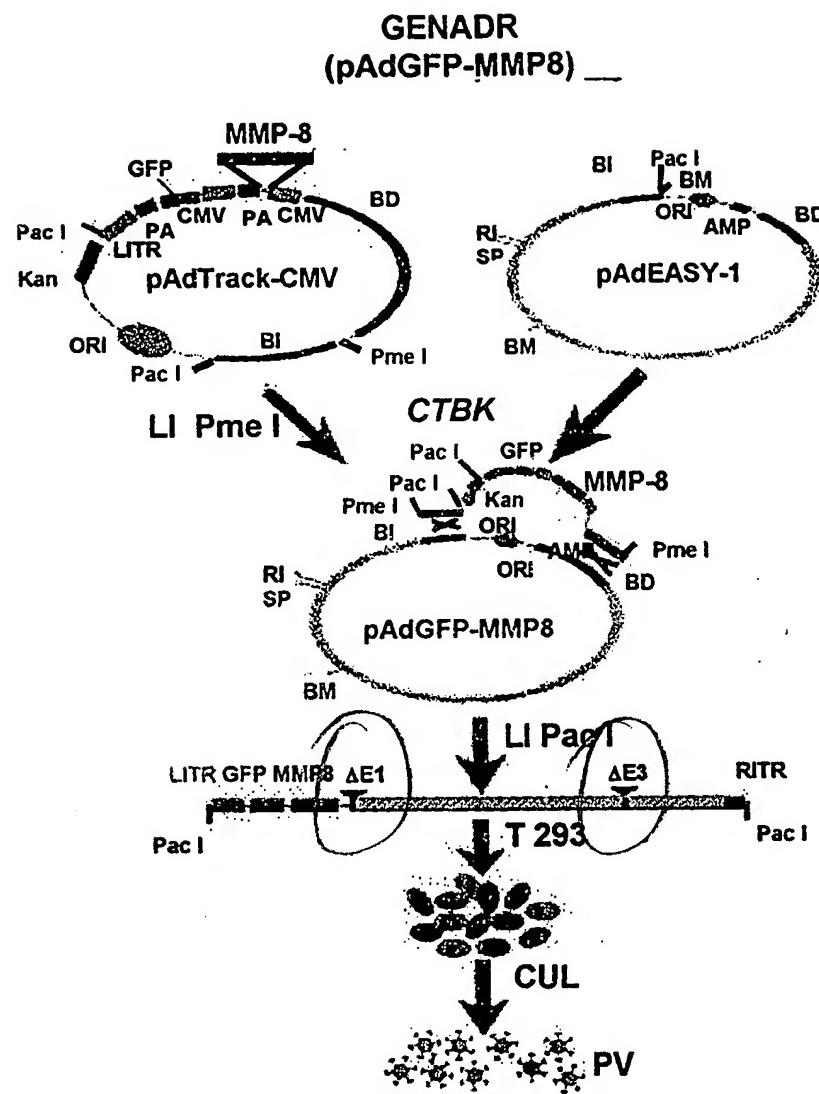


Figura 3

**Figura 4**

4/12

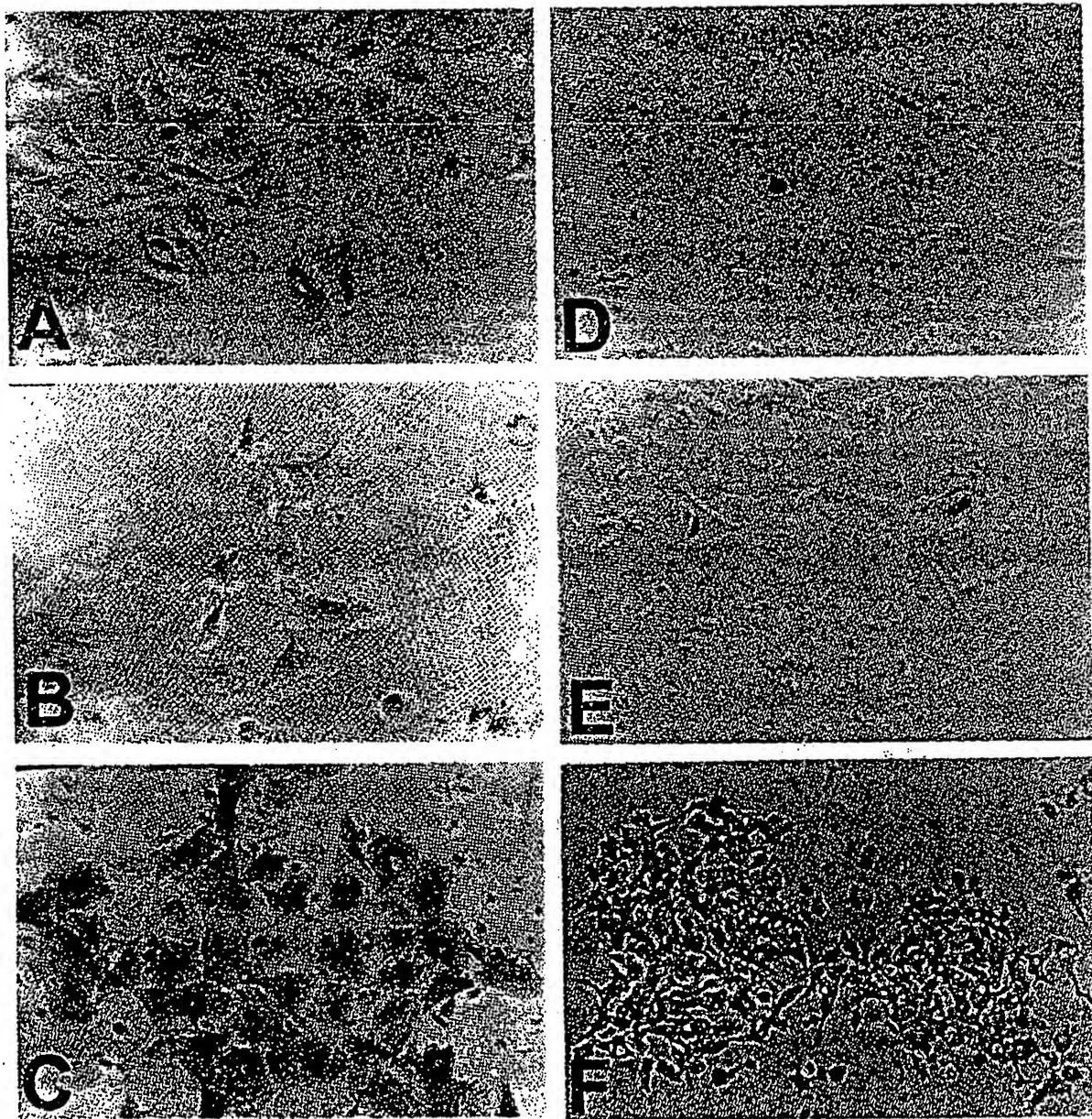


Figura 5

5/12

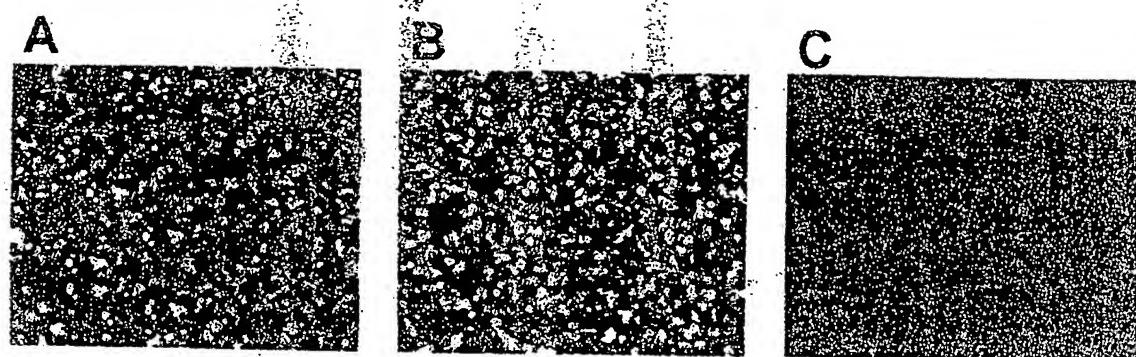


Figura 6

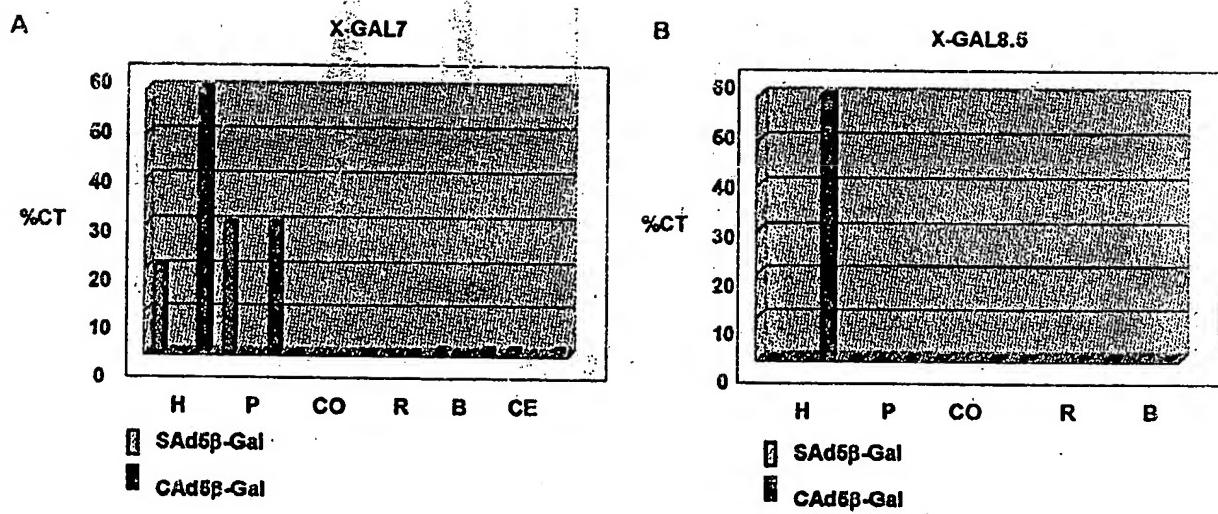


Figura 7

6/12

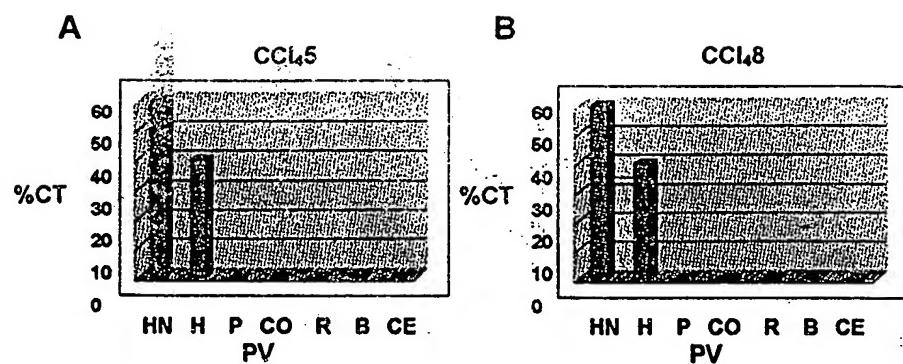


Figura 8

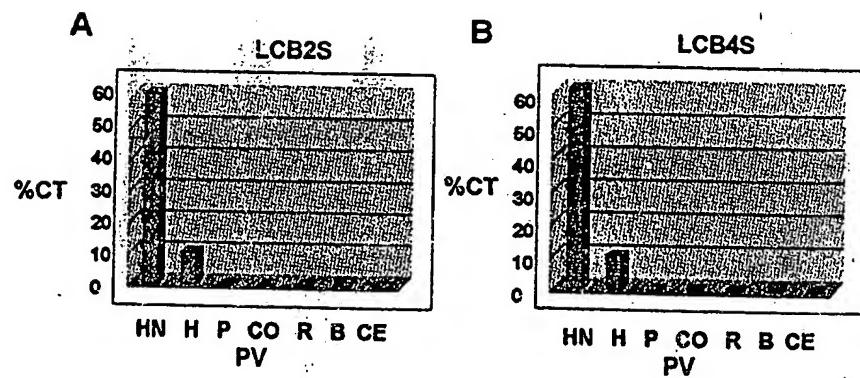


Figura 9

370

7/12

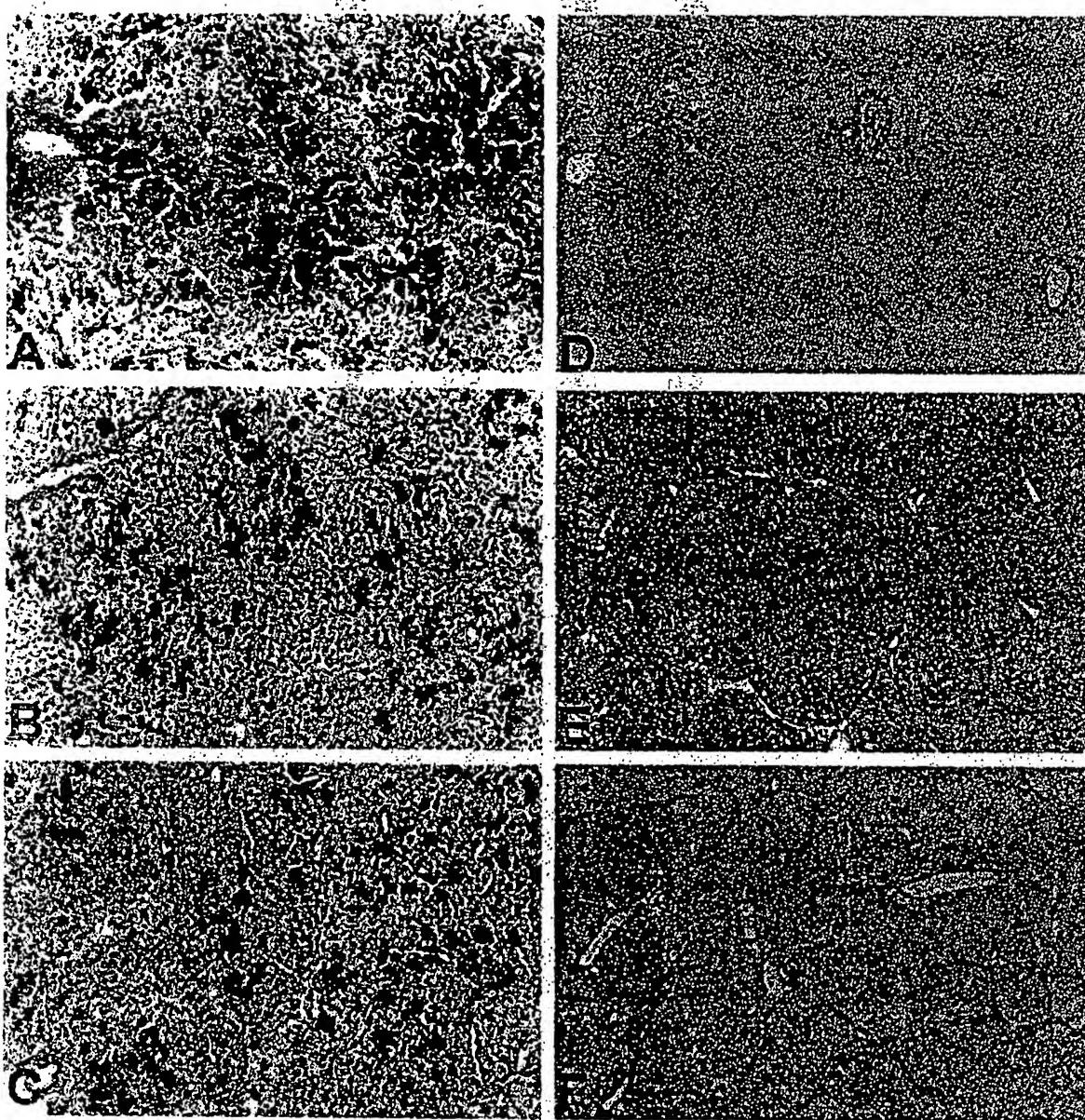


Figura 10

8/12

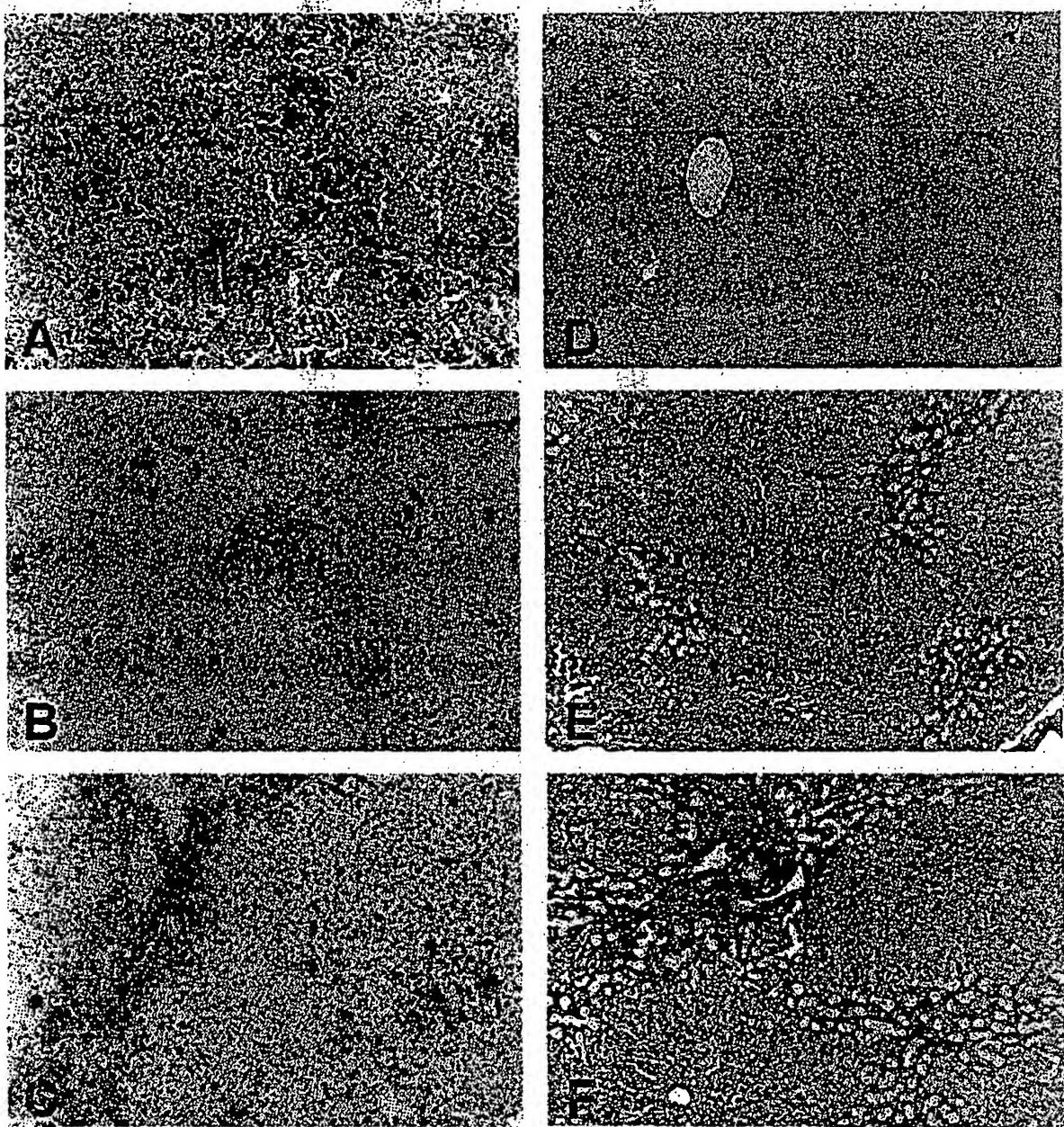


Figura 11

9/12

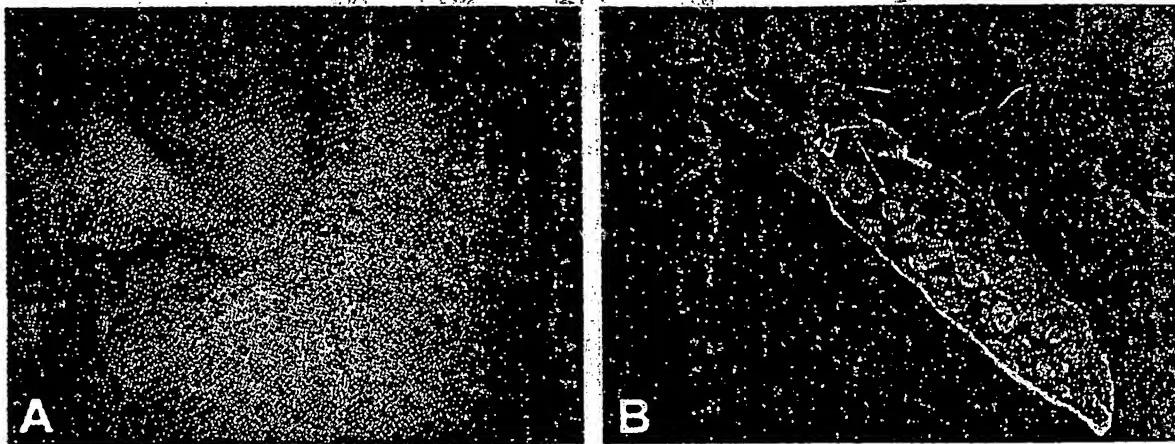


Figura 12

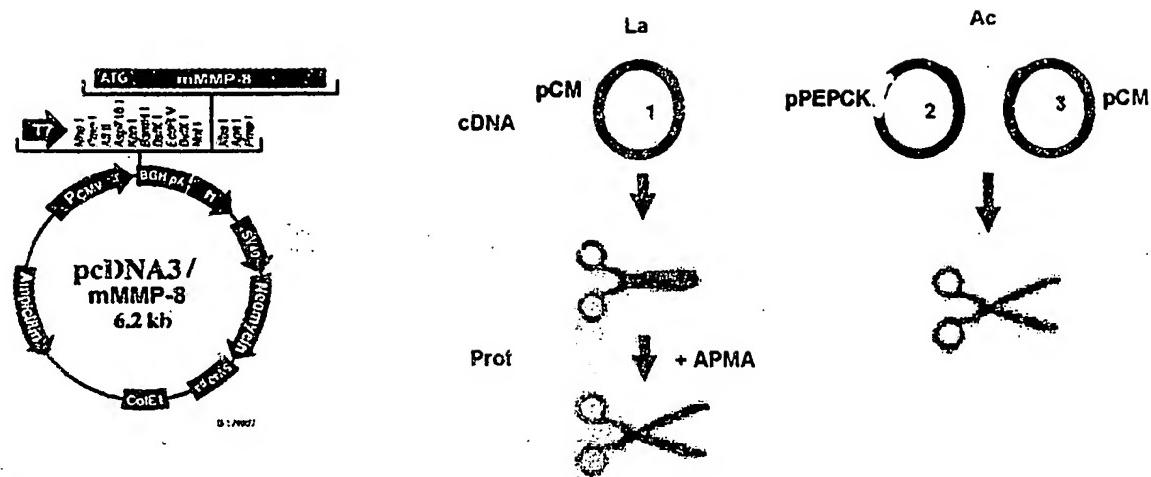


Figura 13

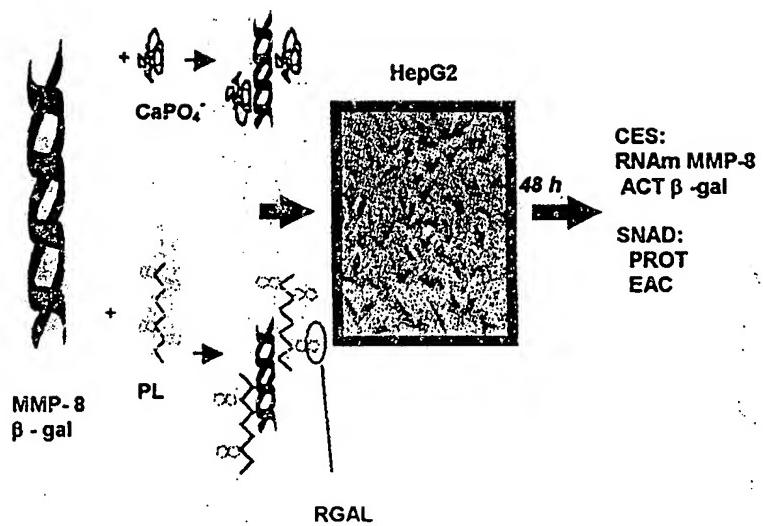


Figura 14

10/12

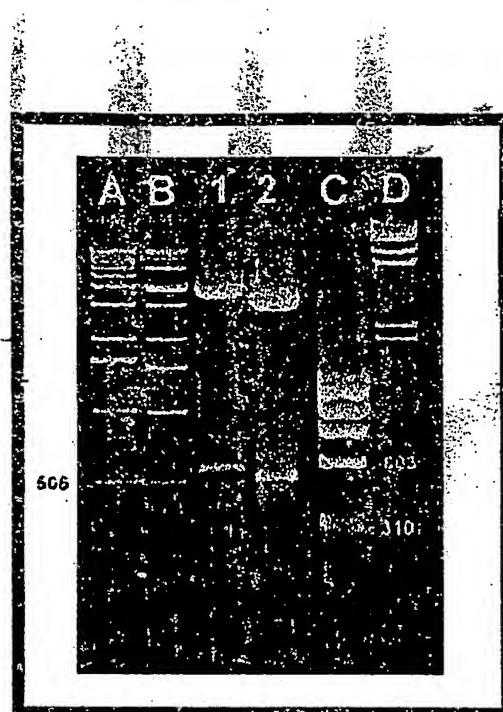


Figura 15

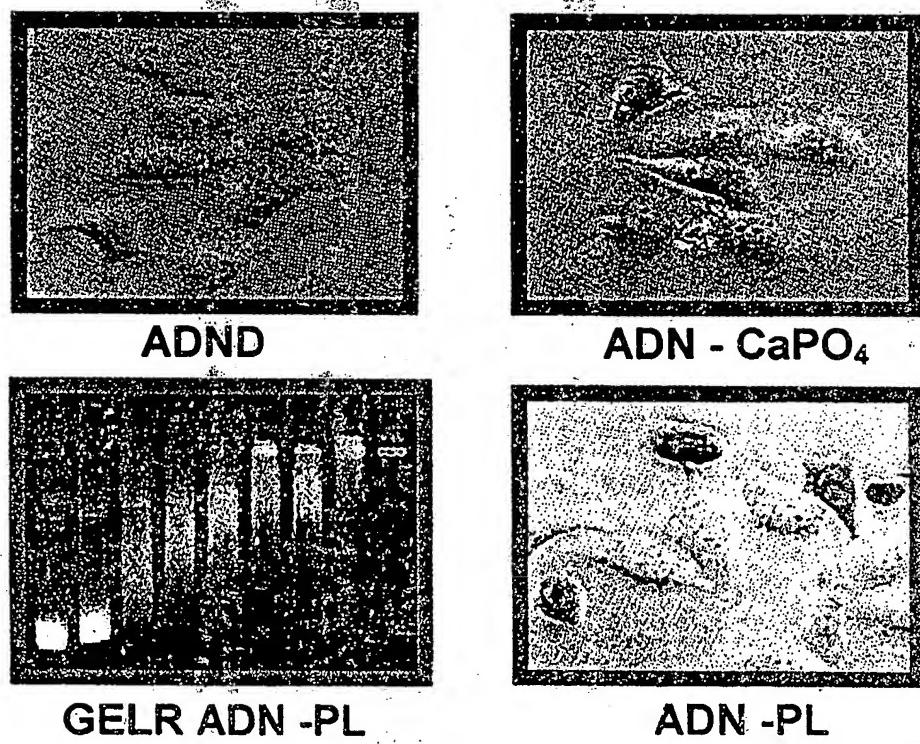


Figura 16

11/12

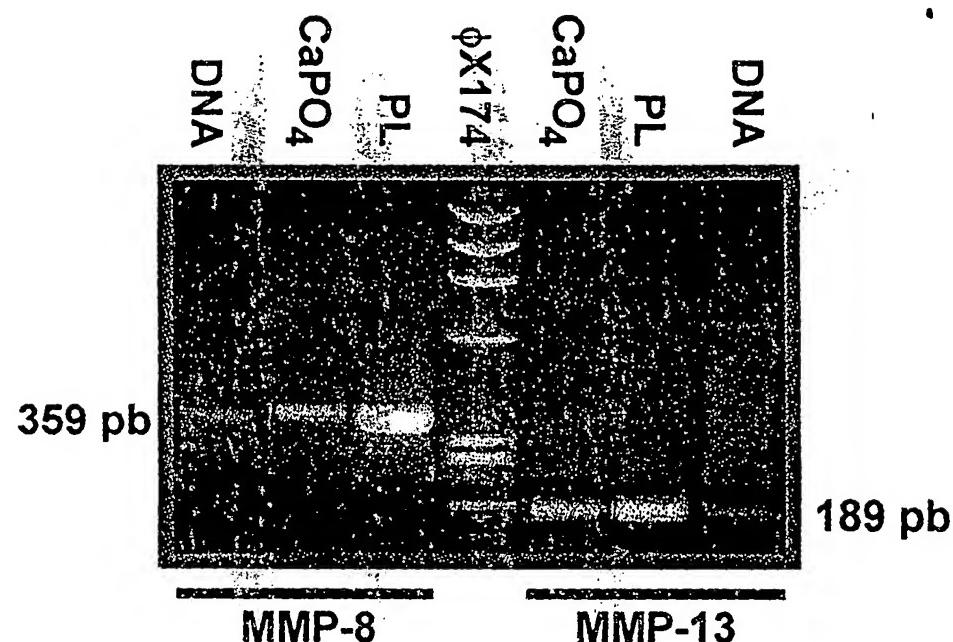


Figura 17

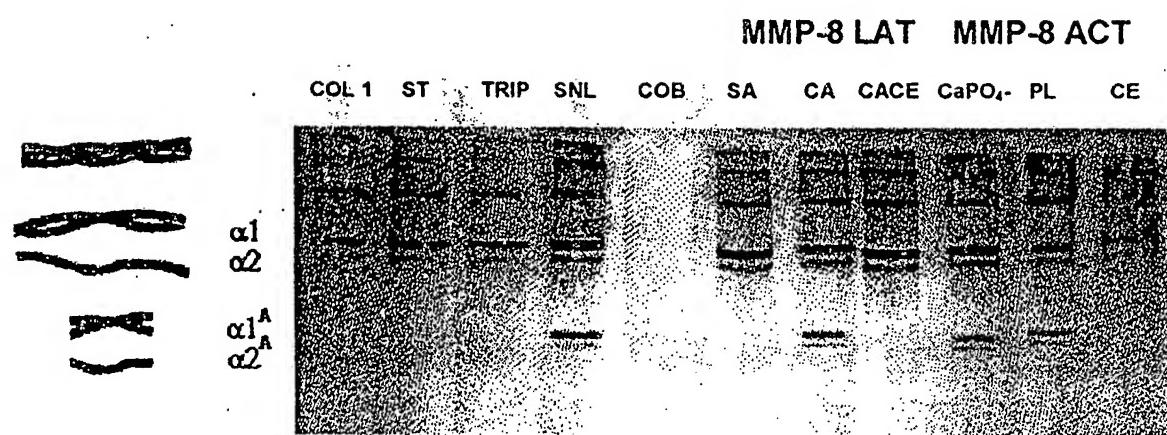


Figura 18

12/12

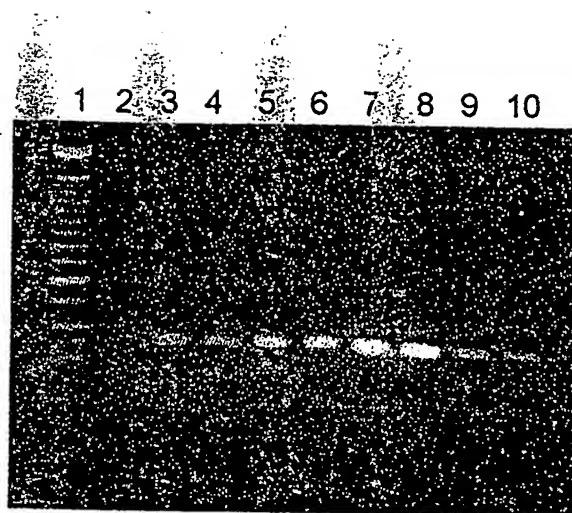


Figura 19

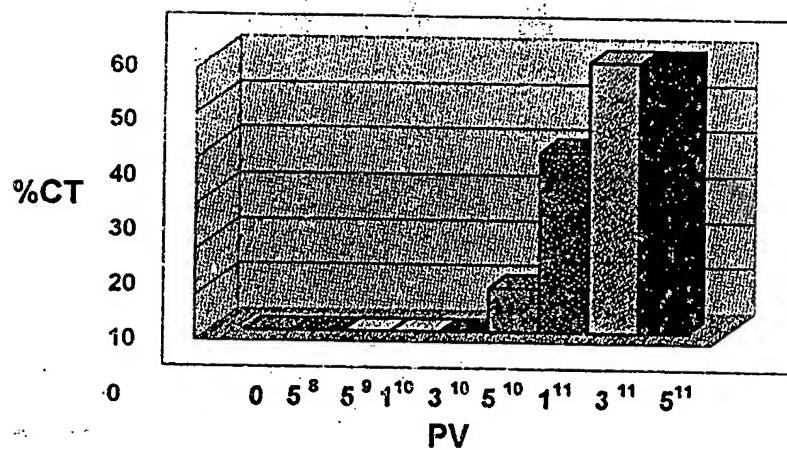


Figura 20

037862

SOLICITUD DE PATENTE NO. 998515
DIRECCION DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCION DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO
ADMINISTRATIVO DE PATENTES
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE 1 P. 2 19
TITULACION Y CONSERVACION DE DERECHOS

DIRECCION DE
PATENTES

33479

C. DIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO
MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

JOSE F. HINOJOSA CUELLAR, Abogado, con domicilio para recibir contestación al presente escrito en Paseo de los Tamarindos No. 400-A piso 9, Col. Bosques de las Lomas, C.P. 05120 México, D.F., atentamente expongo:

Por medio del presente escrito vengo a solicitar que se registre la cesión de derechos de la solicitud de patente que al rubro se indica de: **PIHCSA MEDICA, S.A. DE C.V.**, una compañía organizada y existente conforme a las Leyes de la República Mexicana a: **TGT Laboratories S.A. DE C.V.** una compañía organizada y existente conforme a las Leyes de la República Mexicana, según se desprende del documento de cesión, debidamente notarizado, que en original anexo al presente escrito.

Acredito mi personalidad como apoderado de la nueva titular **TGT Laboratories S.A. DE C.V.**, con un poder debidamente firmado, que en original anexo al presente escrito.

SOLICITUD DE PATENTE: 998515

TITULAR ANTERIOR: PIHCSA MEDICA, S.A. DE C.V.

NACIONALIDAD: Mexicana

TITULAR ACTUAL: TGT Laboratories S.A. DE C.V.

NACIONALIDAD: Mexicana

DOMICILIO DEL

TITULAR ACTUAL: Prolongación División del Norte #4280, Col. Prado Coapa, C.P. 14300, México, D.F.

82

30-100-100

APODERADO:

Lic. José F. Hinojosa Cuellar

DOMICILIO PARA OIR

NOTIFICACIONES:

Paseo de los Tamarindos 400-A, 9° Piso, Col.
Bosques de las Lomas, C.P. 05120, México,
Distrito Federal

De acuerdo con lo anterior, exibo el formato de solicitud, por triplicado, indicando los datos del nuevo titular.

Finalmente, con esta misma fecha cubro los derechos correspondientes que marca la tarifa en vigor.

Por lo anteriormente expuesto,

A USTED C. DIRECTOR, atentamente pido:

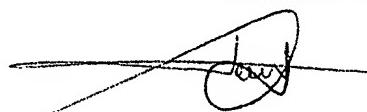
PRIMERO: Tenerme por presentado haciendo las manifestaciones a que se refiere el presente escrito.

SEGUNDO: Previos los trámites correspondientes, tomar nota del cambio de titular y expedir el oficio correspondiente.

ATENTAMENTE

México, D.F., a 11 de septiembre de 2000.

p.p. de: **TGT Laboratories S.A. DE C.V.**



LIC. JOSE F. HINOJOSA CUELLAR
APODERADO



- Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial

 Modelo Dibujo

Uso exclusivo Delegaciones SECOFI	Uso exclusivo del IMPI
Sello	No. de expediente
Folio de entrada	No. de folio de entrada
Fecha y hora de recepción	Fecha y hora de presentación

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor(*) <input type="checkbox"/>	El solicitante es el causahabiente <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): TGT Laboratories S.A. DE C.V.	
2) Nacionalidad (es): MEXICANA	
3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Población, Estado y País:	PROLONGACION DIVISION DEL NORTE #4280, COL. PRADO COAPA, C.P. 14300 MEXICO, D.F.
(*) Debe llenar el siguiente recuadro	4) Teléfono (clave):
	5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
Nombre (s):	DR. JUAN ARMENDARIZ BORUNDA y DR. ESTUARDO AGUILAR CORDOVA
7) Nacionalidad (es):	MEXICANOS
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Población, Estado y País:	AV. PROLONGACION DIVISION DEL NORTE NO. 4280, COL. PRADO COAPA C.P. 14300 MEXICO, DISTRITO FEDERAL
9) Teléfono (clave):	10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)	
11) Nombre (s): LIC: EDUARDO CORREA E., LIC. JOSE F. HINOJOSA CUELLAR, LIC. MARTIN MICHAUS ROMERO	12) R G P:
13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Paseo de los Tamarindos 400 - A, Piso 9 Col. Bosques de las Lomas, Código Postal 05120	
Población, Estado y País: México, D.F. México	
14) Teléfono (clave): 5261-0400	15) Fax (clave): 5261-0496

16) Denominación o Título de la Invención:		
VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES Y SU UTILIDAD EN EL TRATAMIENTO DE DIVERSOS TIPOS DE FIBROSIS HEPATICA, RENAL, PULMONAR Y CICATRICES HIPERTROFICAS.		
17) Fecha de divulgación previa 09 06 99 Día Mes Año	18) Clasificación Internacional	uso exclusivo del IMPI
19) Divisional de la solicitud		20) Fecha de presentación
Número	Figura jurídica	Día Mes Año
21) Prioridad Reclamada: País	Fecha de presentación Día Mes Año	No. de serie

- Comprobante de pago de la tarifa
 Descripción y reivindicación (es) de la invención
 Dibujo (s) en su caso
 Resumen de la descripción de la invención
 Documento que acredita la personalidad del apoderado.

- Documento de cesión de derechos
 Constancia de depósito de material biológico
 Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
 Documento (s) de prioridad
 Traducción

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. JOSE F. HINOJOSA CUELLAR

Nombre y firma del solicitante o su apoderado

MEXICO, D.F. A 17 DE SEPTIEMBRE DE 1999.

Lugar y fecha 205/17480 "kra"

Consideraciones generales para su llenado:

- Este formato de solicitud debe llenarse preferentemente a máquina, no obstante podrá presentarse con letra de molde legible y su distribución es gratuita.
- Este formato de solicitud debe presentarse por triplicado.
- Sólo se recibirá el formato de solicitud debidamente requisitado y en idioma español.
- El formato de solicitud y sus documentos anexos deben presentarse en el Departamento de Recepción y Control de Documentos de Patentes del IMPI, ubicado en Periférico Sur número 3106, 3er piso, colonia Jardines del Pedregal, 01900, México, D.F., en el horario de 9:00 a 16:00 horas de lunes a viernes o en la ventanilla de las Delegaciones o Subdelegaciones Federales de la SECOFI.
- La firma del solicitante debe ser autógrafa en cada formato de solicitud.
- En el formato de solicitud marque con una cruz en el recuadro la solicitud que desea presentar.
- En caso de Registro de Diseño Industrial señale además si se trata de un modelo o un dibujo.
- La denominación o título debe ser connotativa de la invención.
- Si la invención fue divulgada dentro de los doce meses previos a la fecha de presentación de la solicitud, indique la fecha de divulgación y anexe la información comprobatoria que marca el Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- En la solicitud de invención que sea divisional de una solicitud previamente presentada, deberá proporcionar el número de expediente, la figura jurídica y la fecha de presentación de dicha solicitud.
- El derecho de reclamar la prioridad sólo tiene lugar si la presente solicitud ha sido previamente presentada en algún país miembro del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial. Proporcionar los siguientes datos:
- País donde se presentó por primera vez la solicitud, fecha y número asignado a la solicitud en dicho país.
- Las solicitudes podrán remitirse por correo, servicios de mensajería u otros equivalentes, asimismo se podrán presentar por transmisión telefónica facsimilar en términos del artículo 5o. del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial.
- Se autoriza su libre reproducción siempre y cuando no se altere.

Trámite al que corresponde la forma: - Solicitud de Patente, Registro de Diseño Industrial y Registro de Modelo de Utilidad
Número de Registro Federal de Trámites Empresariales: IMPI-00-001

Fecha de autorización de la forma por parte de la Oficialía Mayor de SECOFI: 07-I-1999

Fecha de autorización de la forma por parte de la Unidad de Desregulación Económica: 07-I-1999

Fundamento jurídico-administrativo:

Ley de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27-VI-91, reformas D.O.F. 02-VIII-94; 26-XII-97)

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial (D.O.F. 23-XI-94)

Acuerdo que establece las reglas para la presentación de solicitudes ante el IMPI (D.O.F. 14-XII-94)

Acuerdo por el que se establecen los plazos máximos de respuesta a los trámites ante el IMPI (D.O.F. 10-XII-96)

Tarifa por los servicios que presta el IMPI

Documentos anexos:**Solicitud de Patente y Registro de Modelo de Utilidad**

- Comprobante de pago de la tarifa correspondiente (original y copia)
- Descripción, reivindicación, resumen y dibujo (triplicado)
- Solicitud de Registro de Diseño Industrial
- Comprobante de pago de la tarifa (original y copia)
- Descripción, reivindicación y dibujo o fotografía (triplicado)
- Documentos adicionales que deberán presentarse en su caso:
 - Constancia de depósito de material biológico
 - Acreditación de personalidad del apoderado, en su caso (original)
 - Acreditación del poderdante en el caso de persona moral, señalando el instrumento donde obran dichas facultades y acta constitutiva (original)
 - Documento donde se acredita el carácter del causahabiente o de cesión de derechos (original)
 - Documento comprobatorio de divulgación previa, en su caso (original y copia)
 - Documento de prioridad y su traducción, en su caso (copia certificada expedida por la oficina extranjera)
 - Escrito solicitando el descuento del 50%, cuando corresponda (original)

Tiempo de respuesta:

El plazo máximo de primera respuesta es de 3 meses.

Número telefónico para quejas:

Contraloría Interna en el IMPI 5624-04-12 ó 13 (directo)
5624-04-00 (comutador)
Extensión: 4628, 4629 y 4677

Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite, sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía-SACTEL a los teléfonos: 5480-20-00 en el D.F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01-800-00-14800 o desde Estados Unidos y Canadá al 1-888-594-3372.

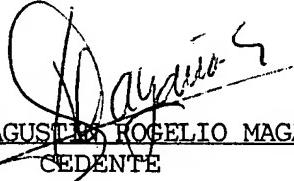
Número telefónico del responsable del trámite para consultas: 5624 04 00 extensión 4748 y 4703

814322

C E S I Ó N

En la Ciudad de México D.F., a los 29 días del mes de Agosto de 2000, PIHCSA MEDICA S.A. DE C.V. sociedad debidamente constituida conforme a las leyes de REPUBLICA MEXICANA cede, vende y traspasa en toda propiedad y dominio a TGT Laboratories S.A. DE C.V. sociedad debidamente constituida conforme a las leyes de REPUBLICA MEXICANA, domiciliada en PROLONGACION DIVISION DEL NORTE #4280 COL. PRADO COAPA CP 14300 MEXICO D.F. todos los intereses, titularidad, derechos y privilegios sobre SOLICITUD DE PATENTE en México número 998515, relativa a VECTORES ADENOVIRALES RECOMBINANTES Y SU UTILIDAD EN EL TRATAMIENTO DE DIVERSOS TIPOS DE FIBROSIS HEPATICA, RENAL, PULMONAR, Y CICATRICES HIPERTROFICAS. El precio de esta cesión es la cantidad de \$ 100.00 (cien pesos 00/100 M.N.), de la cual por medio del presente la Cedente extiende el más amplio y completo recibo.

La cesionaria TGT Laboratories S.A. DE C.V., acepta el traspaso y faculta asimismo a los señores Lics. José F. Hinojosa C., Martín Michaus R., Jaime Higuera R., Ernesto Gómez F. y Eduardo Kleinberg Druker, para que en su nombre y representación, conjunta o separadamente, gestionen ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial de la Ciudad de México, Distrito Federal, el registro de la presente cesión y continúen el trámite del SOLICITUD respectivo.


ING. JOSE AGUSTIN ROGELIO MAGAÑA CASTRO
CEDENTE

TESTIGO


ING. JOSE CARLOS GONZALEZ FERNANDEZ

TESTIGO


ING. ALVARO MARCELO VAZQUEZ GALINA


ING. JOSE AGUSTIN ROGELIO MAGAÑA CASTRO
CESIONARIA

TESTIGO


ING. JOSE CARLOS GONZALEZ FERNANDEZ

TESTIGO


ING. ALVARO MARCELO VAZQUEZ GALINA



HERIBERTO CASTILLO VILLANUEVA, Titular de la Notaría Número Sesenta y Nueve del Distrito Federal, CERTIFICO: Que ante mí compareció el Ingeniero José Agustín Rogelio Magaña Castro, en representación de "PIHCSA MÉDICA", SOCIEDAD ANÓNIMA DE CAPITAL VARIABLE, y de "TGT LABORATORIES", SOCIEDAD ANÓNIMA DE CAPITAL VARIABLE, de quien me cercioré de su identidad y reconoció como suyas dos de las firmas que aparecen en este documento en tres fojas, ratificando ante mí su contenido y me acreditó que las representaciones que ostenta y por las que actúa están vigentes en sus términos con los siguientes documentos: -----

1.- Por lo que se refiere a "PIHCSA MÉDICA", SOCIEDAD ANÓNIMA DE CAPITAL VARIABLE: como sigue: -----

A).- Con escritura número diez mil cuatrocientos quince, de fecha ocho de septiembre de mil novecientos noventa y siete, ante mí, cuyo primer testimonio quedó inscrito en el Registro Público de Comercio de esta Capital en el Folio Mercantil número doscientos veintisiete mil seiscientos veinte, por la que se constituyó "PIHCSA MÉDICA", SOCIEDAD ANÓNIMA DE CAPITAL VARIABLE, con domicilio en esta capital, duración de noventa y uno años, capital social mínimo de CIEN MIL PESOS y máximo ilimitado, cláusula de exclusión de extranjeros, y de dicha escritura copio en su parte conducente lo que es del tenor literal siguiente: -----

"...ARTÍCULO SEGUNDO.- La sociedad tiene por objeto: -----
La fabricación, importación, exportación, compra, venta y distribución de productos e insumos para la salud, medicamentos, aparatos y equipo para la rehabilitación y prótesis, instrumental médico, ropa de todo tipo, aparatos e instrumentos hospitalarios de todo tipo. -----

Para la realización del objeto anterior, la sociedad tiene capacidad para: -----

A.- Ejecutar toda clase de actos de comercio, pudiendo comprar y vender, importar y exportar toda clase de artículos y mercancías relacionadas con el objeto anterior. -----

B.- Contratar activa o pasivamente toda clase de prestaciones de servicios, celebrar contratos, convenios, así como adquirir por cualquier título patentes, marcas industriales, nombres comerciales, opciones y preferencias, derechos de propiedad literaria, industrial, artística o concesiones de alguna autoridad. -----

C.- Formar parte de otras sociedades de objeto similar. -----

D.- Emitir, girar, endosar, aceptar, avalar, descontar y suscribir toda clase de títulos de crédito, sin que se ubiquen en los supuestos del Artículo Cuarto de la Ley del Mercado de Valores. -----

E.- Adquirir acciones, participaciones, partes de interés, obligaciones de toda clase de empresas y sociedades, formar parte en ellas y entrar en comandita, sin que se ubiquen en los supuestos del Artículo Cuarto de la Ley del Mercado de Valores. -----

F.- Aceptar o conferir toda clase de comisiones mercantiles y mandatos, obrando en su propio nombre o en nombre del comitente o mandante. -----

G.- Adquirir o por cualquier otro título poseer y explotar toda clase de bienes muebles, derechos reales y personales, así como los inmuebles que sean necesarios para su objeto. -----

H.- Contratar al personal necesario para el cumplimiento de los fines sociales y delegar en una o varias personas el cumplimiento de mandatos, comisiones, servicios y demás actividades propias de su objeto. -----

I.- La sociedad podrá otorgar avales y obligarse solidariamente por terceros, así como constituir garantías por obligaciones de terceros. -----

J.- Dar y recibir préstamos, con o sin garantía. -----

K.- En general, la realización y emisión de toda clase de actos, operaciones, convenios, contratos y títulos, ya sean

14322

- 2 -

civiles, mercantiles o de crédito.

TRANSITORIOS:

SEGUNDO.- Los comparecientes de esta escritura acuerdan:

I.- Designar como Director General de la Sociedad al Ingeniero José Agustín Rogelio Magaña Castro, quien para el desempeño de su cargo gozará de las siguientes facultades:

1.- Poder general para pleitos y cobranzas, con todas las facultades generales y aún con las especiales que de acuerdo con la Ley requieran poder o cláusula especial, en los términos del párrafo primero del artículo dos mil quinientos cincuenta y cuatro del Código Civil para el Distrito Federal y su correlativo en las demás Entidades Federativas del País.

De manera enunciativa y no limitativa se menciona entre otras facultades:

I.- Para intentar y desistirse de toda clase de procedimientos, inclusive amparo.

II.- Para transigir.

III.- Para comprometer en árbitros.

IV.- Para absolver y articular posiciones.

V.- Para recusar.

VI.- Para hacer cesión de bienes.

VII.- Para recibir pagos.

VIII.- Para presentar denuncias y querellas en materia penal y para desistirse de ellas cuando lo permita la Ley.

Poder general para actos de administración en los términos del párrafo segundo del citado artículo dos mil quinientos cincuenta y cuatro del Código Civil para el Distrito Federal y su correlativo en las demás Entidades Federativas del País.

3.- Poder en materia laboral con facultades expresas para articular y absolver posiciones, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo setecientos ochenta y seis de la Ley Federal del Trabajo, con facultad para administrar las relaciones laborales y conciliar de acuerdo con lo dispuesto en los artículos once y ochocientos setenta y seis, fracciones primera y sexta de la citada Ley, así como comparecer en juicio en los términos de las fracciones primera, segunda y tercera del artículo seiscientos noventa y dos y ochocientos setenta y ocho de la mencionada Ley.

4.- Poder general para actos de dominio de acuerdo con el párrafo tercero del mismo artículo del Código Civil y su correlativo en las demás Entidades Federativas del País.

5.- Poder para otorgar y suscribir títulos de crédito en los términos del artículo noveno de la Ley General de Títulos y Operaciones de Crédito.

6.- Facultad para otorgar poderes generales y especiales y revocar unos y otros".

B).- Con el instrumento doce mil trescientos setenta y dos, de fecha veintiuno de enero de mil novecientos noventa y nueve, ante mí, cuyo primer testimonio quedó inscrito en el Registro Público de Comercio de esta Capital, en el Folio Mercantil número doscientos veintisiete mil seiscientos veinte, por el que se hizo constar la protocolización de un acta de asamblea General Extraordinaria de Accionistas, en la que se acordó entre otros puntos aumentar el capital social en la parte fija a la cantidad de UN MILLÓN DE PESOS, así como reformar el artículo sexto de los estatutos sociales.

2.- Por lo que se refiere a "TGT LABORATORIES", SOCIEDAD ANÓNIMA DE CAPITAL VARIABLE, con escritura número trece mil cuatrocientos veinticinco, de fecha quince de diciembre de mil novecientos noventa y nueve, ante mí cuyo primer testimonio quedó inscrito en el Registro Público de Comercio de esta Capital, en el Folio Mercantil número doscientos cincuenta y siete mil ochocientos cuatro, por la que se constituyó "TGT LABORATORIES", SOCIEDAD ANÓNIMA DE CAPITAL VARIABLE, con domicilio en esta Capital, duración de noventa y nueve años, capital social mínimo de CIEN MIL PESOS, moneda nacional y máximo ilimitado, cláusula de admisión de extranjeros, y de dicha escritura copio en su parte conducente lo que es del tenor literal siguiente:

".....ESTATUTOS:

ARTÍCULO SEGUNDO.- La sociedad tiene por objeto:

La Innovación, desarrollo, adaptación, modificación, fabricación, importación, exportación, transformación, almacenamiento y comercialización, de productos obtenidos mediante la biotecnología, la biología molecular y/o la ingeniería genética, tales como: vectores adenovirales, vectores retrovirales y vectores plasmídicos entre otros, así como





productos derivados de las modificaciones y envío de genes y proteínas desarrolladas para su aplicación en la terapia génica. -----

Para la realización del objeto anterior, la sociedad tiene capacidad para: -----

A.- Ejecutar toda clase de actos de comercio, pudiendo comprar y vender, importar y exportar toda clase de artículos y mercancías relacionadas con el objeto anterior. -----

B.- Contratar activa o pasivamente toda clase de prestaciones de servicios, celebrar contratos, convenios, así como adquirir por cualquier título patentes, marcas industriales, nombres comerciales, opciones y preferencias, derechos de propiedad literaria, industrial, artística o concesiones de alguna autoridad. -----

C.- Emitir, girar, endosar, aceptar, avalar, descontar y suscribir toda clase de títulos de crédito, sin que se ubiquen en los supuestos del Artículo Cuarto de la Ley del Mercado de Valores. -----

D.- Adquirir acciones, participaciones, partes de interés, obligaciones de toda clase de empresas y sociedades y fijar parte en ellas, sin que se ubiquen en los supuestos del Artículo Cuarto de la Ley del Mercado de Valores. -----

E.- Aceptar o conferir toda clase de comisiones mercantiles y mandatos, obrando en su propio nombre o en nombre del comitente o mandante. -----

F.- Adquirir o por cualquier otro título poseer y explotar toda clase de bienes muebles, derechos reales y personales, así como los inmuebles que sean necesarios para su objeto. -----

G.- Contratar al personal necesario para el cumplimiento de los fines sociales y delegar en una o varias personas el cumplimiento de mandatos, comisiones, servicios y demás actividades propias de su objeto. -----

H.- La sociedad podrá otorgar avales y obligarse solidariamente por terceros, así como constituir garantías por obligaciones de terceros. -----

I.- Dar y recibir préstamos con o sin garantía. -----

J.- Comprar, vender, arrendar, acondicionar y dar mantenimiento de los bienes muebles e inmuebles convenientes o necesarios para la mejor realización de los fines anteriormente mencionados. -----

K.- Representar o fungir como agente, comisionista y mediador mercantil, dentro de la República Mexicana o en el extranjero de empresas nacionales o extranjeras, industriales y comerciales, con objetos sociales, afines similares o relacionados con los antes consignados. -----

L.- Alquilar y arrendar toda clase de maquinaria y equipo; -----

M.- En general, la realización y emisión de toda clase de actos, operaciones, convenios, contratos y títulos, ya sean civiles, mercantiles o de crédito. -----

... ----- TRANSITORIOS: ----- SEGUNDO... -----

... II.- Designar como apoderado de la sociedad al Ingeniero José Agustín Rogelio Magaña Castro, quien gozará de las siguientes facultades: -----

1.- Poder general para pleitos y cobranzas, con todas las facultades generales y aún con las especiales que de acuerdo con la Ley requieran poder o cláusula especial, en los términos del párrafo primero del artículo dos mil quinientos cincuenta y cuatro del Código Civil para el Distrito Federal y su correlativo en las demás Entidades Federativas del País, por lo que tendrá entre otras facultades las siguientes: -----

A.- Para intentar y desistirse de toda clase de procedimientos, inclusive amparo. -----

B.- Para transigir. -----

C.- Para comprometer en árbitros. -----

D.- Para absolver y articular posiciones. -----

14322

- 4 -

- E.- Para recusar.
F.- Para hacer cesión de bienes.
G.- Para recibir pagos.

Para presentar denuncias y querellas en materia penal y para desistirse de ellas cuando lo permita la Ley.

Poder general para actos de administración en los términos del párrafo segundo del citado artículo dos mil quinientos cincuenta y cuatro del Código Civil para el Distrito Federal y su correlativo en las demás Entidades Federativas del País.

3.- Poder en materia laboral con facultades expresas para articular y absolver posiciones, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo setecientos ochenta y seis de la Ley Federal del Trabajo, con facultad para administrar las relaciones laborales y conciliar de acuerdo con lo dispuesto en los artículos once y ochocientos setenta y seis, fracciones primera y sexta de la citada Ley, así como comparecer en juicio en los términos de las fracciones primera, segunda y tercera del artículo seiscientos noventa y dos y ochocientos setenta y ocho de la mencionada Ley.

4.- Poder general para actos de dominio de acuerdo con el párrafo tercero del mismo artículo del Código Civil y su correlativo en las demás Entidades Federativas del País.

5.- Poder para otorgar y suscribir títulos de crédito en los términos del artículo noveno de la Ley General de Títulos y Operaciones de Crédito.

6.- Facultad para otorgar poderes generales y especiales y revocar unos y otros.”

Lo anterior consta del instrumento marcado con el número catorce mil trescientos veintidós de esta misma fecha, ante

Doy fe.

Méjico, Distrito Federal, a seis de septiembre del año dos mil.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGES CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE (S) OR EXHIBIT (S) SUBMITTED ARE POOR
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox